



HAL
open science

Mécanismes de défense de la peau : rôle des interactions neurovasculaires

Stéphanie Gohin

► **To cite this version:**

Stéphanie Gohin. Mécanismes de défense de la peau : rôle des interactions neurovasculaires. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10200 . tel-00862791

HAL Id: tel-00862791

<https://theses.hal.science/tel-00862791>

Submitted on 17 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 200-2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT Physiologie et biologie des organismes, population et interactions

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 25 octobre 2011

par

Melle GOHIN Stéphanie

MECANISMES DE DEFENSE DE LA PEAU : ROLE DES INTERACTIONS NEUROVASCULAIRES

Directeur de thèse : Mme le Docteur FROMY Bérengère

JURY :

Rapporteur Pr Pierre ABRAHAM
Rapporteur Pr Jean-Luc CRACOWSKI
Rapporteur Dr Claudine GEHIN
Examinateur Pr Dominique LE GUELLEC
Examinateur Pr Jean Louis SAUMET

Remerciements

Je vous remercie très vivement *Monsieur le Professeur Jean Louis Saumet* pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Je profite de cette occasion pour vous exprimer mon respect, ma reconnaissance et ma gratitude.

Mes plus grands remerciements vont à ma directrice de thèse, *Madame le Docteur Bérengère Fromy*, qui m'a accompagnée tout au long de ma formation depuis 5 ans. Ta disponibilité et tes généreux conseils au cours de certains de mes moments difficiles ont été d'une très grande qualité, et d'un immense réconfort. Tu m'as appris avec beaucoup de sérieux, de patience et de gentillesse à devenir autonome dans mon travail mais aussi dans ma vie personnelle. Merci beaucoup pour ton excellente direction et ton amitié.

Je remercie également, *Madame le Docteur Dominique Sigaud-Roussel*, pour vos précieux conseils, votre participation à l'élaboration et à la réalisation de ce travail de thèse ainsi que votre sympathie. Merci beaucoup pour votre aide tout à long de ma thèse.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, *Monsieur le Pr Pierre Abraham*, *Monsieur le Pr Jean-Luc Cracowski* et *Madame le Dr Claudine Gehin* pour la rapidité avec laquelle ils ont lu et corrigé mon manuscrit afin de l'améliorer et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail de thèse.

Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail, *Monsieur le Pr Dominique Le Guellec* et *Monsieur le Pr Jean Louis Saumet*.

Merci également à *Monsieur le Pr Gerard Morel* pour son aide au cours de ma thèse.

La suite de mes remerciements s'adresse à l'ensemble de mes collègues.

Merci à toi Julien Pelletier pour ton aide, tes discussions professionnelles et personnelles qui nous ont permis de découvrir beaucoup l'un de l'autre.

Merci à toi Marie-Sophie Nguyen-Tu pour ton amitié, ton aide, ton grain de folie qui m'ont permis de passer des mois agréables au laboratoire. S'il te plaît, ne perds jamais ton sourire.

Merci à Audrey Josset Lamaugarny et Gregory James pour leur aide lors des expérimentations.

Je remercie de tout mon cœur ma famille, mes amis et plus particulièrement, une personne de très grande importance dans ma vie, qui m'accompagne et me soutient au quotidien avec la force et l'énergie qui le caractérisent, Geoffey Merlet. Merci.

Et enfin un grand MERCI à mes rats qui ont contribué à faire avancer la science et sans qui rien n'aurait été possible.

RESUME

Au sein du laboratoire, deux mécanismes neurovasculaires indispensables à l'intégrité fonctionnelle de la peau sont étudiés.

La PIV (Pressure-Induced vasodilation) est un mécanisme protecteur qui permet de retarder l'ischémie tissulaire. Des études antérieures ont suggéré l'implication du système nerveux central dans ce mécanisme. La première partie de ma thèse était de préciser le contrôle spinal dans la PIV et de regarder si la perte de ce mécanisme protecteur augmente le risque d'escarres. Nous avons montré l'implication de la voie sensorielle spinale dans la PIV ainsi que la corrélation directe entre la perte de ce mécanisme et l'augmentation du risque d'escarres chez des animaux sains.

La CIV (current-induced vasodilation) a été décrite comme étant un mécanisme neurovasculaire de type « réflexe d'axone ». Exclusivement étudiée chez l'homme, les mécanismes impliqués restent limités. La seconde partie de ma thèse était de développer un modèle animal et approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents de la CIV cathodale. Après avoir développé un modèle animal, nous avons prouvé l'implication de la voie COX1/PGIS/PGI2/IP, des TRPV1 et des ASIC cutanés présents sur les fibres capsaïcino-sensibles ainsi que celles des récepteurs aux CGRP et à la substance P dans la CIV cathodale chez le rat sain.

Pour conclure, la PIV est un outil diagnostique intéressant pour évaluer les capacités protectrices de la peau contre les lésions ischémiques de pression en conditions physiologiques. La CIV reflète de la libération endogène de PGI2 dans la peau, offrant un outil complémentaire à la réponse à l'acétylcholine afin d'évaluer les capacités globales de l'endothélium.

MOTS-CLES : transduction sensorielle spinale, escarres, vasodilatation induite par la pression, prostacyclines, vasodilatation induite par le courant.

TITLE : DEFENSIVE MECHANISM OF THE SKIN : ROLE OF NEUROVASCULAR INTERACTION.

SUMMARY :

In our lab, two neurovascular mechanisms required for functional integrity of the skin are studied.

The pressure-Induced vasodilation (PIV) is a protective mechanism, which delays the occurrence of tissue ischemia likely protecting the skin against pressure. Previous studies suggested the contribution of the central nervous system in this mechanism. In the first part of my PhD, we studied the spinal sensory transduction involvement in PIV and verify whether the lack of PIV increased incidence of pressure-induced ischemic lesions in healthy rats. We showed that spinal sensory disruption led to the loss of cutaneous PIV directly associated with increased incidence and severity of cutaneous lesions in response to prolonged ischemic compression in healthy animals.

The current-induced vasodilation (CIV) is a neurovascular mechanism described as axon reflex mechanism. Exclusively studied in humans, the understanding of involved mechanisms remains limited. In the second part of my PhD, we aimed to develop an animal model and precise the underlying mechanisms involved in cathodal CIV. That we developed, we proved the involvement of the COX1/PGIS/PGI₂/IP pathway, the cutaneous TRPV1 and ASIC channels present on capsaicin-sensitive fibres and the cutaneous CGRP and NK1 receptors in cathodal CIV in healthy rats.

To conclude, PIV is an interesting tool to evaluate the protective capacities of the skin to withstand pressure in healthy conditions. CIV by reflecting the endogenous release of PGI₂ in healthy skin offers a novel tool in complement to acetylcholine response in order to assess global capacities of the endothelium.

KEYWORDS : sensory transduction spinal, pressure ulcer, pressure-induced vasodilation, prostacyclin, current-induced vasodilation.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : FRE CNRS 3310 - Peau & Interactions neurovasculaires- Institut de Biologie et de Chimie des Protéines - 7, passage du Vercors 69367 Lyon cedex 7 FRANCE

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
RESUME	4
LISTE DES PUBLICATIONS.....	8
ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION GENERALE	11
CHAPITRE 1 :	14
LA PEAU : ORGANE PROTECTEUR	15
1) Structures et fonctions de la peau.....	15
2) La microcirculation cutanée.....	19
2.1) Architecture de la vascularisation cutanée.....	19
2.2) Structure anatomique des microvaisseaux cutanés	20
3) L'innervation de la peau	22
3.1) Récepteurs cutanés.....	22
3.2) Les fibres nerveuses sensorielles cutanées	23
3.3) Les voies spinales	24
MECANISMES NEUROVASCULAIRES DE LA PEAU.....	27
1) Vasodilatation induite par la pression.....	27
2) Vasodilatation induite par le courant.....	32
CHAPITRE 2 :	34
EXPLORATION FONCTIONNELLE DE LA MICROCIRCULATION CUTANEE <i>IN VIVO</i> ..	35
1) Outils.....	35
1.1) Fluxmétrie du laser Doppler	35
1.2) Iontophorèse.....	36
2) Protocoles <i>in vivo</i> chez le rat anesthésié	38
2.1) Etude de la vasodilatation induite par une pression locale	38
2.2) Etude de la vasodilatation induite par le courant	39
2.3) Etude de la vasodilatation dépendante de l'endothélium.....	39
2.4) Etude de la vasodilatation indépendante de l'endothélium.....	39
ETUDE DE L'INCIDENCE D'ESCARRES	41
1) Outils : l'aimant et le laser Doppler Imageur.....	41
2) Protocole.....	42
EXPLORATION <i>EX VIVO</i> DE LA PEAU	44
1) Outils.....	44
2) Protocole.....	45
EXPLORATION HISTOLOGIQUE DE LA PEAU	46
1) Outils.....	46
2) Protocole.....	46
EXPLORATION FONCTIONNELLE DES FIBRES NERVEUSES	47

1) Test thermique nociceptif: Tail Flick.....	47
2) Test mécanique nociceptif : Randall Sellito	48
3) Test mécanique nociceptif : Von Frey.....	48
CHAPITRE 3 :	50
TRAVAIL PERSONNEL	51
1) La PIV.....	51
La vasodilatation induite par la pression et l'implication des COX-1	51
La vasodilatation induite par la pression et l'implication des canaux TRPV1 et des récepteurs CGRP cutanés	54
La vasodilatation induite par la pression, la transmission spinale nociceptive et l'incidence d'escarres	58
2) La CIV.....	81
Mise en place d'un modèle animal pour l'étude de la CIV	81
La vasodilatation induite par le courant et les facteurs endothéliaux (PG et NO)	82
La vasodilatation induite par le courant et les fibres capsaïcino-sensibles	94
La vasodilatation induite par le courant et l'implication des TRPV1 et CGRP spinaux	116
La vasodilatation induite par le courant et l'inflammation neurogénique	120
CHAPITRE 4 :	125
DISCUSSION GENERALE	126
1) La PIV en conditions physiologiques.....	126
2) La CIV en conditions physiologiques.....	131
SYNTHESE	137
1) Rôle potentialisateur des prostacyclines sur les fibres nerveuses	137
2) Candidats endogènes possibles des TRPV1 au niveau spinal	138
3) Similitudes et différences entre la PIV, la CIV et l'inflammation neurogénique	139
PERSPECTIVES	143
1) La PIV.....	143
2) La CIV.....	144
CONCLUSION GENERALE	146
ANNEXE 1.....	147
BIBLIOGRAPHIE.....	148

Liste des publications

Article publié :

Gohin S, Sigaud-Roussel D, Conjard-Duplany A, Dubourg L, Saumet JL, Fromy B (2011). "What can current stimulation tell us about the vascular function of endogenous prostacyclin in healthy rat skin in vivo?" J Invest Dermatol **131**(1): 237-44.

Article soumis :

Gohin S, Sigaud-Roussel, Saumet JL, Fromy B. "Antagonism of TRPV1 and ASIC channels attenuates cutaneous vasodilator response to cathodal stimulation in healthy rats" J Applied Physiol JAPPL-00951-2011.

Communications affichées à des congrès :(Poster Annexe 1)

Gohin S, Sigaud-Roussel D, Conjard-Duplany A, Dubourg L, Saumet JL, Fromy B (2011). "**Involvement of endogeneous prostacyclin in current stimulation in rat healthy skin in vivo**":

- 9th World Congress for Microcirculation, Paris, France, septembre 2010.
- Congrès P2T de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, Grenoble, France, mars 2011.

Abréviations

AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
ACh	Acétylcholine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ASIC	Acid-sensing ion channels
BKCa	Canaux potassiques au calcium de forte conductance
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CIV	Current-induced Vasodilation
COX	Cyclooxygénase
DRG	Ganglions rachidiens dorsaux
EDHF	Facteur hyperpolarisant endothélial
GC	Gyanylate cyclase
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
i.p	intrapéritonéale
i.t	intrathécale
i.v	intraveineuse
KATP	Canaux potassiques sensibles à l'ATP
LDF	Laser Doppler Fluxmétrie
L-NNA	NG-nitro-L-arginine
NADA	N-arachidonoyl-dopamine
NHE	Echangeur sodium/proton
NK	Neurokinine
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO Synthase
PG	Prostaglandine
PGI2	Prostacycline
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PGIS	Prostacycline synthase

PIV	Pressure-Induced Vasodilation
SNC	Système nerveux central
SNP	Nitroprussiate de sodium
SP	Substance P
TREK-1	TWIK1-related K channels
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
TxA2	Tromboxane A2
VIP	Vasoactif intestinal peptide

INTRODUCTION GENERALE

La peau est l'organe vivant le plus lourd et le plus étendu du corps humain. En constant renouvellement, la surface de la peau est bien plus qu'une simple enveloppe. Sa fonction principale est de fournir une barrière entre nous et l'environnement extérieur, mais pas seulement comme nous allons le développer dans le chapitre 1. Sans ce revêtement de protection, notre vie sur terre serait impossible.

La peau possède ainsi différentes fonctions physiologiques lui conférant un rôle de protection contre les pressions, les modifications chimiques et bactériologiques. Un grand nombre de ces fonctions physiologiques repose sur la structure de la peau (p.15-18) mais aussi sur sa microcirculation (p.19-21).

En général, la communauté scientifique s'intéresse plus à la macrocirculation qu'à la microcirculation. Ainsi, des nombreuses fonctions de la microcirculation cutanée restent à être élucidées. De plus, certaines idées émergentes démontrent de plus en plus que la microcirculation pourrait être le reflet de l'état général de la circulation (Safar et al. 2007). Pour ces diverses raisons, la compréhension de la microcirculation est importante à étudier.

Au sein de la microcirculation, des structures cellulaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses...), nerveuses (fibres myélinisées et non myélinisées) et moléculaires (neuropeptides, canaux ioniques, récepteurs...) permettent à la peau de répondre et de s'adapter à des modifications extérieurs via la libération d'ions et de molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Ces modifications vont faire appel à des mécanismes vasculaires et neurovasculaires responsables de vasodilatations, vasoconstrictions, chimio-attraction des cellules inflammatoires...

Les réponses cutanées modulant le flux sanguin cutané sont indispensables pour l'homéostasie de la peau. Ainsi certaines études ont démontré que les réponses suite à un stress thermique (Saria et al. 1983), les pressions externes, les inflammations (Stucker et al. 2002) et la cicatrisation sont très importantes et nécessitent un peu d'attention de notre part.

L'équipe « peau et interactions neurovasculaires » au sein de la FRE 3310 travaille sur l'étude des réponses neurovasculaires, en particulier les vasodilatations induites par l'application locale d'une pression (PIV, « pressure-induced vasodilation ») et induites par l'application locale d'une stimulation électrique (CIV, « current-induced vasodilation ») présentées dans le chapitre 1 (p.27-33). Présentant des similitudes mécanistiques comme l'implication des fibres capsaïcino-sensibles (Durand et al. 2002a; Fromy et al. 1998; Fromy et al. 2000), l'étude de ces deux mécanismes doit être poursuivie afin de mieux appréhender leurs rôles cutanés.

La PIV, mécanisme décrit comme étant protecteur de la peau vis-à-vis des pressions extérieures permet de retarder l'ischémie tissulaire. La PIV, découverte chez l'homme (Fromy et al. 1998) puis chez le rongeur (Fromy et al. 2000; Sigaudou-Roussel et al. 2004), est un mécanisme physiologique médié par les fibres capsaïcino-sensibles (Fromy et al. 2000) induisant le relargage des neuropeptides (CGRP, PACAP, VIP) et la libération endothéliale du monoxyde d'azote et des prostaglandines.

Nous avons donc voulu préciser la participation des prostaglandines au niveau vasculaire et l'identification des récepteurs cutanés classiquement présents sur les fibres capsaïcino-sensibles au niveau nerveux dans le mécanisme de la PIV à l'aide d'outils pharmacologiques (p.51-57).

La PIV a souvent été perçue comme un mécanisme purement local or, ce mécanisme de protection est absent lors de l'inactivation du système nerveux central (Fizanne et al. 2003) et lors de l'activation du système nerveux central (Fromy et al. 2007).

Après cette suggestion sur la participation du système nerveux central dans la PIV, le but de ma thèse sur la PIV était de démontrer l'implication d'une voie spinale et de celle de certains récepteurs et canaux spinaux grâce à des outils pharmacologiques injectés directement au niveau spinal (p.58-80).

De plus, la perte de ce mécanisme protecteur de la peau vis-à-vis de l'ischémie est souvent associée à des populations à risque d'escarres (Demiot et al. 2006; Fromy et al. 2010).

Classiquement décrit comme une protection de la peau contre l'ischémie exercée par des pressions, nous avons voulu démontrer l'association directe entre la perte de la PIV décrivant l'état général de la peau vis-à-vis des faibles pressions et l'augmentation de l'incidence d'escarres lors d'une perte transitoire de transduction sensorielle spinale. Cette étude a été réalisée à l'aide d'outils pharmacologiques (p.58-80).

Le deuxième mécanisme neurovasculaire, la CIV, a d'abord été découvert chez l'homme aux deux polarités mais avec une meilleure vasodilatation à la cathode qu'à l'anode (Asberg et al. 1999; Droog et al. 2003; Durand et al. 2002a; Grossmann et al. 1995). Les études cliniques sur la CIV ont démontré l'implication des cyclooxygénases et suggéré l'implication des COX-1 (Durand et al. 2002d; Durand et al. 2003; Tartas et al. 2005b). De plus, l'étude de ce mécanisme semble très importante car l'utilisation du courant pour favoriser la cicatrisation est de plus en plus réalisée sur des plaies chroniques de types escarres sans pour autant comprendre son fonctionnement (Gault et al. 1976; Mehmandoust et al. 2007; Ramadan et al. 2008).

Afin de poursuivre les études cliniques antérieures et d'étudier la cascade de la CIV cathodale, nous avons développé un modèle animal. Une fois développé, la compréhension mécanistique de la CIV cathodale (étude des facteurs endothéliaux au niveau vasculaire et étude des canaux/récepteurs présents sur les fibres capsaïcino-sensibles) a été menée grâce à des outils pharmacologiques et des techniques immuno-enzymatiques (p.81-115).

La CIV est décrite chez l'homme comme un mécanisme axone reflexe longtemps décrit comme purement local et caractérisé par un flare et une inflammation neurogénique dépendante de l'intensité de la stimulation. Cependant, certaines études montrent que les réponses axones reflexes peuvent être contrôlées partiellement par le système nerveux central (Kanai et al. 2006; Sun et al. 2004a).

Après ces récentes observations sur l'axone reflexe, nous avons voulu vérifier si la voie spinale contrôlait également la CIV cathodale à l'aide de blocages spinaux. Enfin une étude brève sur le flare à distance de la vasodilatation initiale et sur l'inflammation neurogénique a également été réalisée (p.116-124).

CHAPITRE 1 :

Le chapitre 1 présente la structure et les composants de la peau (microcirculation et innervation) afin de les replacer dans le contexte des mécanismes neurovasculaires (PIV et CIV) étudiés tout au long de cette thèse.

Ce premier chapitre montre clairement les objectifs des études à mener pour préciser l'influence du contrôle spinal dans la PIV ainsi que son influence sur l'incidence d'escarres quand ce mécanisme de protection est absent.

La peau : Organe protecteur

1) Structures et fonctions de la peau

La peau possède de nombreuses fonctions qui en font un organe complet. Les fonctions de la peau peuvent être divisées en différentes parties. Son côté protecteur du fait de la barrière physique contre les forces mécaniques, les infections, les produits chimiques, les irradiations ultra-violettes est essentiel... La peau nous permet également de ressentir toutes modifications thermiques et mécaniques grâce à la transduction sensorielle cutanée qui peuvent aller de la sensation tactile et agréable à la douleur. La peau est capable d'avoir des échanges avec l'extérieur uniquement si cela n'est pas nocif. Chez l'homme, elle joue un rôle de régulateur de la température et permet de s'adapter à la température extérieure. Enfin, la peau possède aussi la capacité de se défendre et de se réparer en cas de lésions, d'avoir la capacité de présenter les antigènes aux cellules inflammatoires et de permettre ainsi les réactions immunologiques et indispensables à la cicatrisation des plaies.

Pour assurer toutes ces fonctions, la peau a une structure adaptée.

La peau est un organe composé de trois couches de tissus, de l'extérieur vers l'intérieur du corps : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

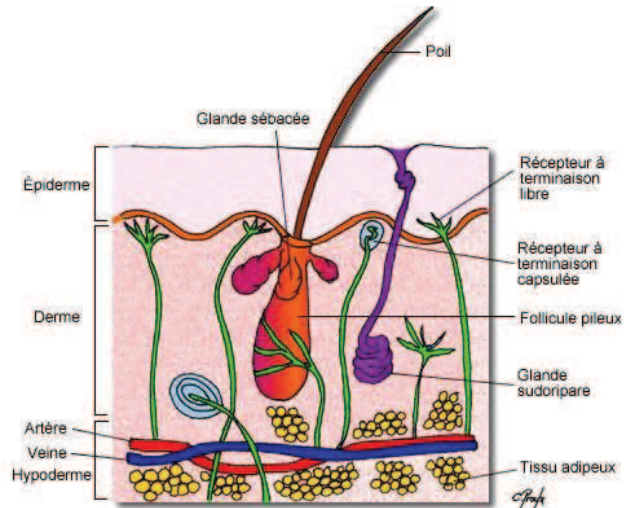


Figure 1. Structure schématisée de la peau (Tortora et al. 2000).

L'épiderme désigne le tissu de nature épithéliale qui recouvre le derme. Les kératinocytes sont le principal type cellulaire représenté dans ce tissu, cellules extrêmement dynamiques qui subissent une prolifération et une différenciation permanente aux termes desquelles elles se transforment en cellules mortes (cornéocytes), s'éliminant régulièrement par desquamation. L'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. Les cellules qui le composent sont alimentées par diffusion depuis le derme. Il contient par contre de nombreuses terminaisons nerveuses libres, nous permettant d'avoir une perception tactile et douloureuse. Au sein de l'épiderme, quatre couches sont à distinguer (Figure 2).

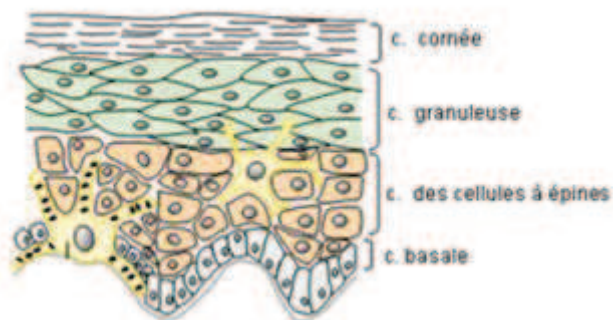


Figure 2. Structure schématique de l'épiderme (Tortora et al. 2000).

- La couche cornée, *Stratum corneum*, est une couche constituée de cellules très épaisses, les cornéocytes qui ne possèdent pas de noyau et qui sont remplies de kératine. Ces cellules sont jointives sauf sur la partie superficielle, où elles se tassent. Cette couche permet à la peau d'avoir un pH acide à sa surface (pH<6) indispensable contre l'invasion bactérienne extérieure.
- La couche granuleuse, *Stratum granulosum* est la couche la plus foncée, contenant 3 ou 4 assises de cellules. Ces cellules contiennent des grains de keratohyaline (ou profilaggrine).
- La couche de Malpighi ou couche des cellules à épines (*Stratum spinosum*) contient des kératinocytes (responsable de la dureté de la peau). Cette couche contient des tonofilaments, précurseurs de la kératine, des mélanocytes (cellules produisant de la mélanine responsable de la pigmentation cutanée), des terminaisons nerveuses mais aussi des cellules de Langerhans (macrophages qui phagocytent les impuretés et sont impliqués dans les dermatites de contact et les phénomènes inflammatoires).
- Et pour finir, la couche basale (*Stratum germinativum*) où les kératinocytes forment une seule assise de cellules, tenues entre elles par des desmosomes. C'est dans cette couche dite aussi couche germinative, que les cellules se divisent, l'une des deux (cellule souche) reste dans la couche basale tandis que l'autre migrera dans les couches supra-basales. Comme pour tout épithélium, la couche basale repose sur une lame basale où s'ancrent des fibres de réticuline sur le versant chorionique.

Le derme se compose de protéines fibreuses appelées collagène et élastine, qui permet la souplesse de la peau. Un réseau de vaisseaux sanguins, de nerfs, de fibroblastes (cellules participant à la synthèse des macromolécules) et de cellules du système immunitaire (comme les lymphocytes, les mastocytes et les macrophages tissulaires), de glandes, de pores et de follicules pileux est retrouvé dans cette couche. Le derme est irrigué par un réseau sanguin microcirculatoire qui prend en charge la nutrition de l'épiderme par diffusion. Outre son rôle nutritif, le derme joue également un rôle primordial dans la thermorégulation chez l'homme et dans la cicatrisation ainsi que dans l'élimination de produits toxiques (par la sueur).

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé qui contient selon les endroits plus ou moins de tissu adipeux. Il contient des muscles, des veines et artères, de la graisse et des cellules. Le sébum et la sueur produit par l'huile et les glandes de sueur dans le derme forment un film hydrolipidique sur la peau. Ce film, connu sous le nom de « manteau

acide » lubrifie la surface de la peau, aide à repousser des bactéries, maintient le niveau légèrement acide de la peau et protège contre l'irritation. L'hypoderme protège également l'organisme des chocs physiques, des variations de température et sert de réserve adipeuse.

2) La microcirculation cutanée

2.1) Architecture de la vascularisation cutanée

Les microvaisseaux sont nombreux dans la peau, retrouvés à la fois dans le derme et dans l'hypoderme. Comme dans la circulation sanguine générale, il existe un réseau artériel et un réseau veineux.

Le réseau artériel dermique est un réseau sous papillaire avec des artérioles de petit calibre, destinées aux papilles dermiques. Il véhicule le sang oxygéné dans le sens « aller », c'est à dire du cœur vers le reste du corps.

Le réseau veineux dermique est un réseau sous papillaire avec des veinules qui partent des papilles dermiques et qui véhicule le sang dépourvu d'oxygène dans le sens « retour ». Entre ces deux réseaux, il existe des connexions appelées « anastomoses artério-veinulaires » qui jouent un rôle dans la thermorégulation, en particulier. Un réseau lymphatique superficiel est également présent sur tout le revêtement cutané.

La circulation cutanée est formée de plusieurs millions de plexus veineux-capillaires sous-épithéliaux (entrelacement entre les veines et les capillaires), et de vaisseaux de transfert situés plus profondément dans le derme. Au sein des plexus se déroulent les échanges métaboliques et de facteurs de croissance avec l'épiderme et les annexes pilo-sébacées et sudoripares. La plupart de ces vaisseaux d'échange ont une structure veinulaire. Les extrémités ont en plus une richesse particulière en anastomoses artériolo-veinulaires à tous niveaux de profondeur. Les parois des vaisseaux sont relativement résistantes. Le flux sanguin y est extrêmement réactif et en instabilité permanente.

La microcirculation cutanée a des fonctions qui lui sont propres car elle permet le maintien de la pression artérielle par un tonus vasoconstricteur, la nutrition de l'épiderme et des annexes cutanées, la thermorégulation, la tolérance par la peau à de longues périodes d'ischémies dues à la pression extérieure appliquée au corps. Ce réseau de microvaisseaux assure certaines de ces fonctions par l'intermédiaire de l'endothélium et des cellules musculaires lisses.

Le système vasculaire périphérique ou cutané est constitué d'artères qui se divisent en artérioles puis en réseaux de capillaires où se font les échanges de gaz et de molécules

dissoutes. Ces capillaires vont ensuite devenir des veinules, puis des veines qui retournent au cœur. Les artérioles, capillaires et veinules cutanés sont organisés en réseau très complexes (Figure 3).

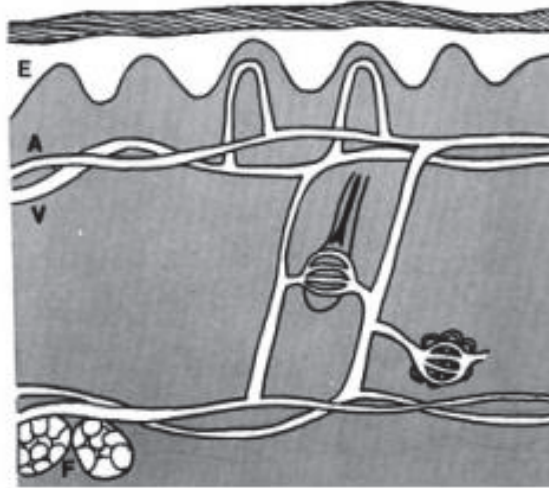


Figure 3. Représentation schématique de l'organisation de la microcirculation cutanée. E=épiderme, A=artériole, V=Veinule, F= grasse sous cutanée (Braverman 2000).

2.2) Structure anatomique des microvaisseaux cutanés

Les microvaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques morphologiquement distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, la média et l'adventice. L'importance et la complexité de ces trois tuniques dépendent du vaisseau sanguin (Figure 4).

L'intima est constituée d'une mono-couche de cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif. Ces cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang circulant et donc avec les métabolites, les hormones, et tout ce que peut transporter le sang.

La média contient exclusivement des cellules musculaires lisses et des constituants extracellulaires : fibres élastiques, fibrilles d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène, protéoglycanes.

L'adventice est peu ou très présente selon le type de vaisseaux. En général, l'adventice est constituée de fibres de collagène caractérisées en tunique externe. Elle contient également quelques fibres élastiques épaisses et des fibroblastes.

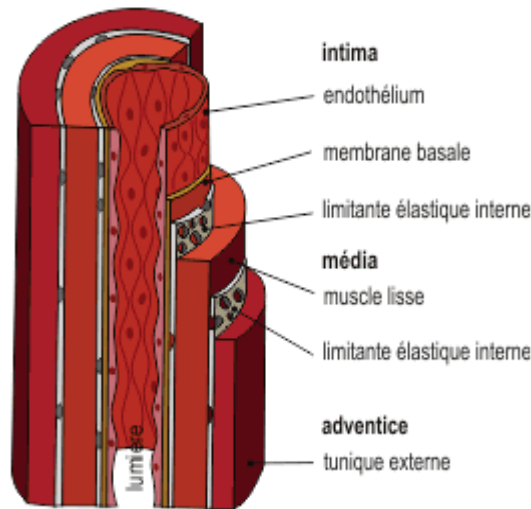


Figure 4. Structure schématique des microvaisseaux (Tortora et al. 2000).

2.2.1) Les artérioles

Les artérioles (20-30 μm) possèdent différentes tuniques, une tunique interne comme celle des artères, une tunique moyenne composée de cellules musculaires lisses et de quelques fibres élastiques et une tunique externe composée principalement de fibres élastiques et de fibres collagènes.

Les artérioles jouent un rôle de régulateur de l'écoulement sanguin. Ainsi, la contraction des cellules musculaires lisses induit une vasoconstriction et une relaxation, une vasodilatation.

2.2.2) Les capillaires

Les capillaires (5-8 μm) font suite aux artérioles et sont constitués d'une seule couche de cellules endothéliales qui reposent sur une membrane basale. Le rôle principal des capillaires est l'échange entre le sang et les tissus.

2.2.3) Les veinules

Les veinules (8-30 μm) font suite aux capillaires, elles sont constituées de cellules musculaires lisses et de fibres conjonctives et élastiques lui permettant une remarquable propriété de distensibilité. Le réseau veineux est un véritable réservoir à capacité variable qui permet d'ajuster à chaque instant le volume sanguin microcirculatoire.

3) L'innervation de la peau

3.1) Récepteurs cutanés

Un certain nombre de récepteurs cutanés ou structures plus complexes sont capables de recevoir et de traduire l'information du stimulus en signal électrique. Ces récepteurs sont retrouvés dans les couches superficielles ou profondes de la peau (Figure 5).

Ainsi, en plus des éléments constitutifs des tissus conjonctifs, l'épiderme, le derme et l'hypoderme contiennent de très nombreux nerfs indispensables aux différentes fonctions de la peau. Il existe les terminaisons nerveuses du système nerveux autonome, amyéliniques, destinées aux vaisseaux et aux annexes épidermiques ; les terminaisons nerveuses des voies de la sensibilité, myélinisées ou amyéliniques et les terminaisons nerveuses libres.

Au niveau de l'épiderme, ces terminaisons libres classiquement décrites dans les phénomènes douloureux correspondent à la sensibilité nociceptive, et plus récemment, à la sensibilité tactile. Les terminaisons libres comprennent les mécanorécepteurs, les thermorécepteurs et les nocicepteurs. Les mécanorécepteurs sont à adaptation lente, sensibles à la pression situés dans la peau avec des poils, leur fibre nerveuse afférente est amyélinisée. De plus, ils sont peu sensibles à l'étirement. Les thermorécepteurs (chaud et froid) répartis sur toute la peau, sont présents sur les fibres nerveuses afférentes myélinisées A δ et les fibres afférentes non myélinisées C qui vont être décrites ci-dessous. Enfin, les nocicepteurs ou récepteurs à la douleur sont sensibles au pincement, à la piqûre, aux températures supérieures à 43°C ou inférieures à 20°C, aux algogènes (bradykinine), et sont présents sur les fibres nerveuses afférentes A δ et C.

Au niveau du derme, plusieurs structures capables de répondre aux stimuli extérieurs sont retrouvées. La sensibilité tactile subtile possède ses propres corpuscules sensitifs spécifiques situés dans l'épiderme (disques de Merkel et terminaisons sensibles annexées aux poils). Les corpuscules de Meissner sont responsables de la détection du tactile fin et peuvent répondre aussi à des déformations dynamiques de la peau. Les corpuscules de Ruffini sont des structures répondant pincement de la peau.

Dans l'hypoderme se trouvent les corpuscules de Vater-Paccini et les corpuscules de Golgi-Mazzoni. Ils enregistrent la sensibilité à la pression sur la peau.

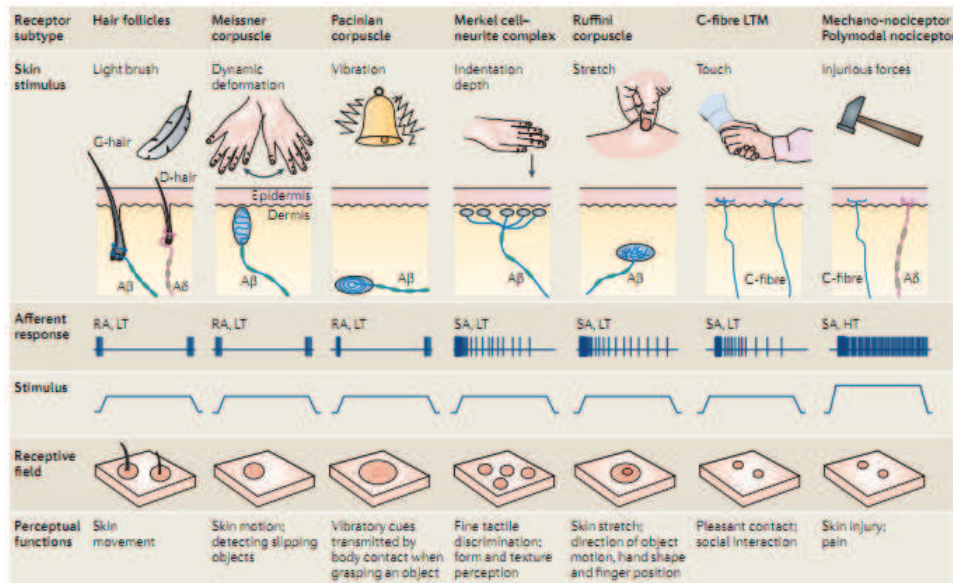


Figure 5. Différents récepteurs cutanés chez les mammifères ainsi que leurs stimuli (Delmas et al. 2011).

3.2) Les fibres nerveuses sensorielles cutanées

Dans nos études, nous nous intéressons plus particulièrement aux fibres nerveuses sensorielles cutanées, il est donc important de les décrire plus en détails. Elles sont différenciées en 2 groupes, les fibres A (ou myélinisées) et les fibres C (sans gaine de myéline) (Lloyd 1962). Les fibres A sont elles même divisées en 3 sous groupes, les A α , les A β et enfin les A δ ayant des tailles, des vitesses de conceptions et des fonctions différentes (Figure 6).





Type de fibre nerveuse	Information véhiculée	Gaine de myéline	Diamètre (μm)	Vitesse de conduction (m/s)
A- α	Proprioception	myélinisée	13-20	80-120 
A- β	Toucher	myélinisée	6-12	35-90 
A- δ	Douleur (mécanique et thermique)	myélinisée	1-5	5-40 
C	Douleur (mécanique, thermique et chimique)	non-myélinisée	0.2-1.5	0.5-2 

Figure 6. Classification des fibres nerveuses sensorielles.

La douleur aiguë surgit après les stimuli qui créent des dommages au niveau des tissus par l'activation des terminaisons sensorielles de type C ou A δ , définis comme des nocicepteurs, par des mécanismes liés à la nociception (Smith et al, 2009). La majorité des autres types de fibres sensorielles comme le toucher, possède des structures plus spécialisées à leur extrémité (les corpuscules de Pacini, de Messner...), or les fibres nociceptives n'ont aucune spécialisation de ce type. Ce sont « des terminaisons libres » qui forment des arborisations multiples denses. La majorité des fibres A δ et des fibres C finissent comme les terminaisons nerveuses libres. Ces fibres nerveuses ont surtout été étudiées dans les mécanismes de douleur (mécanique, thermique, électrique) mais de plus en plus elles sont étudiées dans des mécanismes tactiles (toucher, pression). La douleur rapide véhiculée par les fibres A δ est responsable de la douleur localisée. Ces fibres sont associées au froid et à la pression, et les nocicepteurs donnent l'information rapide de douleur. Les fibres C sont considérées comme des fibres polymodales parce qu'elles peuvent répondre aux stimuli thermiques, mécaniques, et chimiques. En raison de leur vitesse plus élevée de conduction, les fibres A δ sont responsables de la première sensation. Elles répondent à une intensité plus faible de stimulus. La douleur tardive diffuse véhiculée par les fibres C amyéliniques est responsable de la douleur diffuse lente. Après un relai au niveau des structures du tronc cérébral, l'information douloureuse rejoint le thalamus médian, puis les structures limbiques et le cortex frontal (voie de l'émotion et du comportement). Ces fibres C répondant à une intensité plus forte de stimulus sont responsables de la douleur lente et plus durable (inflammation). Depuis quelques années les dogmes des classements des fibres nerveuses périphériques sont remis en question. Ainsi, les fibres C ne sont pas uniquement impliquées dans la douleur mais elles peuvent également être impliquées dans des stimuli non douloureux (pression, courant faible intensité) qualifiés de fibres C tactiles (Delmas et al. 2011; Fromy et al. 2008; Olausson et al. 2002).

3.3) Les voies spinales

La peau est innervée par les rameaux cutanés des nerfs spinaux. Il existe 31 paires de nerfs spinaux chez l'homme comprenant 8 cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacraux et 1 coccygien. Alors que chez le rat, il n'existe que 30 paires de nerfs spinaux, séparées en 7 cervicaux, 13 thoraciques, 6 lombaires et 4 sacraux. Ce sont ces ramifications qui permettent à la peau de plus largement ressentir l'environnement extérieur.

L'innervation de la peau et la perception du toucher, de la douleur et autres sensations peuvent se faire grâce à plusieurs types de structures et de fibres nerveuses capables d'emprunter deux voies spinales jusqu'au système nerveux central, la voie lemniscale et la voie extra-lemniscale. L'information rejoint ensuite le système nerveux central par l'intermédiaire des fibres périphériques. Le message sensitif arrive au niveau de la moelle épinière puis dans le tronc cérébral (Figure 7).

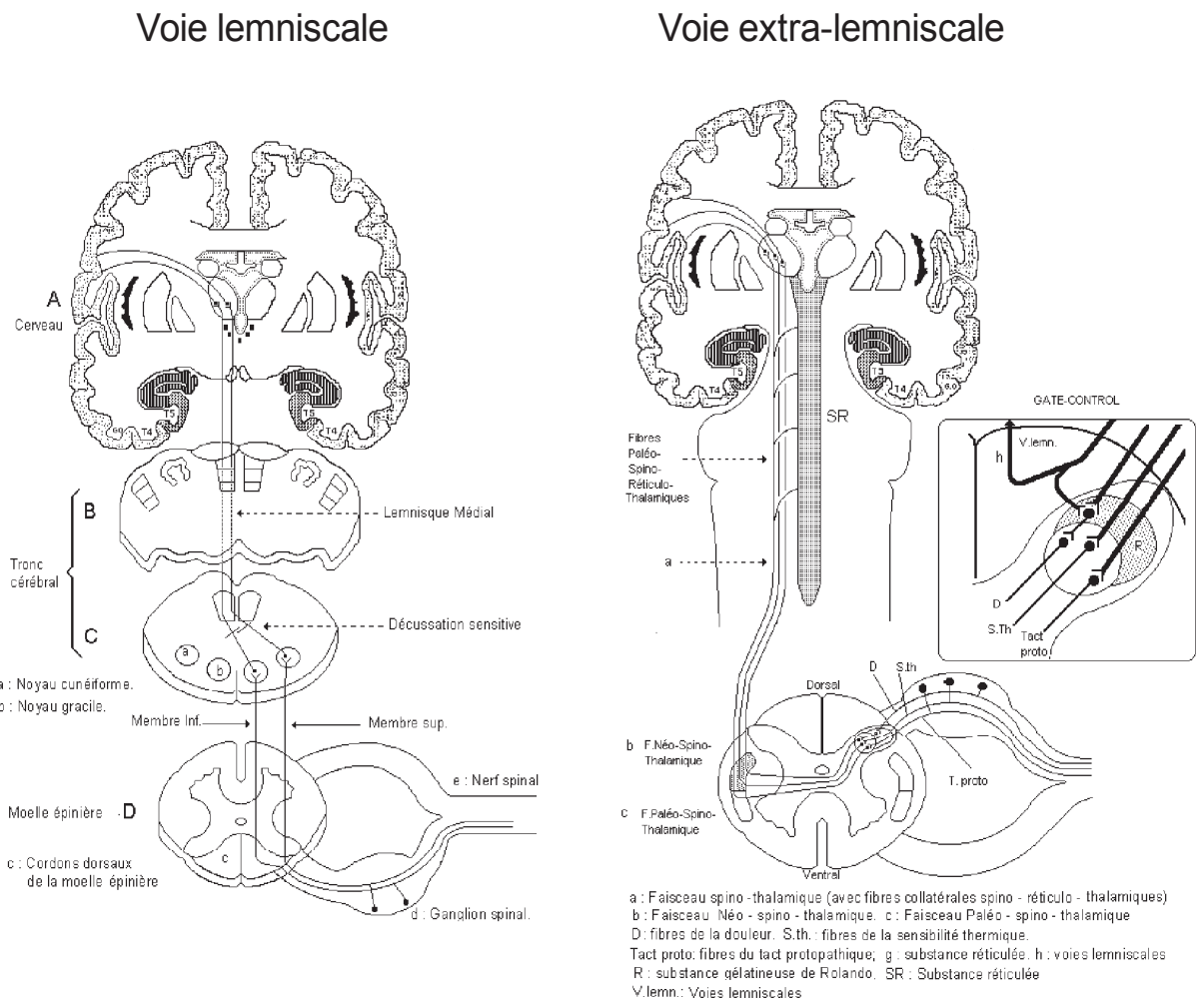


Figure 7. Les deux voies de sensibilités lemniscales (A) et extra-lemniscales (B) (Boutillier et al. 2000).

Il est classiquement décrit que la voie des sensibilités lemniscales transporte la sensibilité tactile ou thermique subtile, la sensibilité proprioceptive consciente c'est-à-dire la perception de soi-même, la sensibilité à la pression et enfin la sensibilité ostéo-périostée

vibratoire (tissu conjonctif/os). Le message sensitif (douleur, chaud-froid...) naît au niveau des récepteurs situés au niveau de la peau. Il chemine alors par les fibres nerveuses (axones entourés de la myéline du système nerveux central) selon la nature du message véhiculé (douleur ou non, thermique, mécanique, vibratoire), puis il remonte alors dans la moelle épinière du côté homolatéral, croise la ligne médiane, remonte dans le tronc cérébral, fait relais dans le thalamus (situé dans la profondeur du cerveau) pour ensuite être interprété au niveau des hémisphères cérébraux dans des aires du cortex spécialisés dans la sensibilité.

La voie extra-lemnisciale est constituée de plusieurs faisceaux. Le faisceau spino-thalamique ventral (ou paléo-spino-thalamique) transporte la sensibilité dont l'excès de stimulation donne une sensation douloureuse profonde, confuse et imprécise s'accompagnant éventuellement de réactions végétatives (pâleur et nausées). Ce faisceau donne des rameaux collatéraux à la substance réticulée du tronc cérébral. Le faisceau spino-thalamique dorsal (ou néo-spino-thalamique) transporte les sensations thermiques et les sensations douloureuses, brèves et précises (douleur superficielle). Ces faisceaux montent dans le cordon latéral de la moelle épinière puis dans le tronc cérébral pour atteindre le thalamus. Une partie seulement des fibres gagne directement le thalamus, le reste aboutissant par de nombreuses collatérales à la substance réticulée du tronc cérébral (faisceau spino-réticulo-thalamique). Cette dernière voie est impliquée dans la transmission de la douleur. Dans le système spino-thalamique, le message croise la ligne médiane, remonte du côté opposé dans la moelle épinière pour se terminer pour une partie dans le tronc cérébral et pour l'autre partie vers le thalamus et les aires du cortex cérébral (aires de la sensibilité mais aussi connexions avec des aires motrices, des aires intervenant dans les émotions, dans la fabrication de certaines hormones, d'où le caractère pluri-dimensionnel de toute la douleur).

Mécanismes neurovasculaires de la peau

J'ai fait ma thèse dans un laboratoire spécialisé dans l'exploration fonctionnelle neurovasculaire cutanée. Deux mécanismes neurovasculaires reposant sur l'intégrité fonctionnelle de la peau ont été largement étudiés. Un, répondant par une vasodilatation locale suite à l'application d'une pression non nociceptive (PIV pour « pressure-induced vasodilation ») caractérisé comme un mécanisme protecteur vis-à-vis de l'ischémie. Et l'autre répondant également par une vasodilatation locale suite à l'application d'une stimulation électrique non nociceptive (CIV pour « current-induced vasodilation ») caractérisé comme un mécanisme d'axone réflexe. La PIV et la CIV sont donc deux outils d'exploration cutanée intégrative, quand beaucoup d'autres outils explorent séparément le versant vasculaire ou le versant nerveux.

1) Vasodilatation induite par la pression

La peau est soumise en permanence à des pressions extérieures sous l'effet de la gravité liée à notre présence sur terre. En position debout et pendant la marche, les pressions au niveau du pied peuvent aller de 0 à 400 kPa (0 et 3000 mmHg) (Betts et al. 1991). En position assise ou couchée, les pressions au niveau des proéminences osseuses varient de 20 kPa à 67 kPa (150 à 500 mmHg) (Betts et al. 1991). Ces fortes pressions exercent une compression de la peau jusqu'aux microvaisseaux cutanés et induisent une réduction de l'approvisionnement sanguin nécessaire à l'intégrité des fonctions physiologiques cutanées ainsi qu'un manque d'oxygénation des tissus cutanés. Si les pressions sont élevées ou appliquées pendant un temps prolongé, l'ischémie et la nécrose peuvent apparaître comme l'ultime conséquence et induire une escarre qui peut avoir des conséquences dramatiques pour les patients à risque allant jusqu'à l'amputation entraînant des conséquences sociales et économiques très lourdes. En revanche chez le sujet sain, ces contraintes ne provoquent que très rarement de nécrose, probablement grâce à l'existence de mécanismes protecteurs de l'ischémie au niveau des zones de pression.

Au sein du laboratoire, un mécanisme a été mis en évidence pouvant jouer ce rôle protecteur, la vasodilatation induite par la pression (PIV). En effet, l'application progressive

d'une pression est capable d'induire une augmentation significative et transitoire du flux sanguin cutané au niveau de la peau permettant de retarder l'apparition de l'ischémie. La PIV a été découverte chez l'homme puis confirmée chez le rat et la souris offrant des modèles expérimentaux nous permettant d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes physiologiques mis en jeu (Fromy et al. 1998; Fromy et al. 2000; Sigaudou-Roussel et al. 2004). La perte de la PIV a souvent été associée à un risque important de développer des lésions ischémiques, or aucune étude ne l'a démontrée directement. L'un des buts de ma thèse est donc de prouver que la perte de la PIV est directement associée à une incidence élevée d'escarres.

Chez l'homme, un traitement chronique local par la capsaïcine abolit la PIV. Ces résultats ont été confirmés chez le rat traité par la capsaïcine à la naissance. Chez l'animal comme chez l'homme, la PIV est donc médiée par les fibres capsaïcino-sensibles. Cependant, les récepteurs cutanés qui initient l'activation des fibres afférentes primaires restent inconnus. L'activation des fibres nerveuses afférentes capsaïcino-sensibles est associée à la libération de neurotransmetteurs dont les plus étudiés sont le CGRP (Calcitonin gene-related peptide), VIP (Peptide Vasoactif Intestinal), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide), et les neurokinines (substance P, neurokinines A et B) préalablement décrit dans des mécanismes associés à la douleur (Szallasi et al. 1999). Ces neurotransmetteurs peuvent être étudiés à l'aide d'antagonistes pharmacologiques spécifiques responsables du blocage de leurs récepteurs. Des études pharmacologiques ont ainsi été menées pour identifier le rôle de ces neurotransmetteurs dans la PIV dans des conditions physiologiques. Les résultats de ces études ont montrés que le CGRP joue un rôle important alors que les neurokinines ne sont pas impliquées dans cette réponse à la pression (Fizanne et al. 2004; Fromy et al. 2000).

Le VIP et le PACAP, polypeptides synthétisés et libérés par des neurones du système nerveux central et périphérique, sont des neuropeptides ubiquitaires. Il existe aujourd'hui deux grands types de récepteurs : d'une part les récepteurs VPAC1 et VPAC2, polyvalents pour le VIP et le PACAP, et d'autre part les récepteurs PAC1, spécifiques du PACAP et de très faible affinité vis-à-vis du VIP. Dans une étude menée sur ces neuropeptides, l'implication des récepteurs VPAC1 et VPAC2 dans le développement de la PIV a été démontrée suggérant le rôle du VIP et/ ou du PACAP (Fizanne et al. 2004).

Une fois libérés par les fibres capsaïcino-sensibles, les neuropeptides peuvent induire une relaxation dépendante ou indépendante de l'endothélium (Roosterman et al. 2006). Si les récepteurs présents sur les cellules musculaires lisses sont activés, ils vont permettre la

production d'AMPc via l'activation de l'adénylate cyclase. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc dans les cellules musculaires lisses stimule alors la protéine kinase A (PKA), qui ouvre des canaux de K^+ et active des mécanismes de séquestration de Ca^{2+} pour induire la relaxation de muscle lisse vasculaire indépendante de l'endothélium. En revanche, si les récepteurs présents sur les cellules endothéliales sont activés, ils vont par le biais d'une augmentation calcique intracellulaire permettre la synthèse de facteurs endothéliaux (NO, PG et facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)) qui agiront au niveau des cellules musculaires lisses pour induire une relaxation dépendante de l'endothélium (Vanhoutte 2001).

Dans le cadre de la PIV, les neuropeptides (CGRP, VIP/PACAP) vont se fixer sur leurs récepteurs endothéliaux respectifs (CGRP R, VPAC1 et VPAC2). Une fois ces récepteurs activés, ils vont concourir à l'augmentation calcique par l'intermédiaire des canaux TREK-1 (Garry et al. 2007). Cette augmentation calcique va donc permettre l'activation des enzymes telles que les NOS et les COX conduisant à la production de NO et de prostaglandines (Fromy et al. 2000). La diffusion de NO dans les cellules des muscles lisses adjacentes va activer la guanylate cyclase et par conséquent le GMPc menant à la relaxation grâce à la diminution de Ca^{2+} . Les prostaglandines (PG) vasodilatarices possèdent des récepteurs couplés à une protéine G sur les cellules musculaires lisses qui vont diminuer le Ca^{2+} via l'AMPc et induire la relaxation (Brain et al. 2004). De plus, l'implication des canaux potassiques BKCa et KATP a été démontrée dans la PIV induisant l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires (Garry et al. 2005).

Si l'EDHF ne semble pas impliqué dans la PIV en conditions physiologiques (Garry et al. 2003), il semble prendre le relais d'une déficience endothéliale comme dans le cas du vieillissement permettant de conserver au mieux la PIV (Gaubert et al. 2007).

L'ensemble des études cliniques et expérimentales a permis de proposer un schéma des voies impliquées dans la PIV (Figure 8).

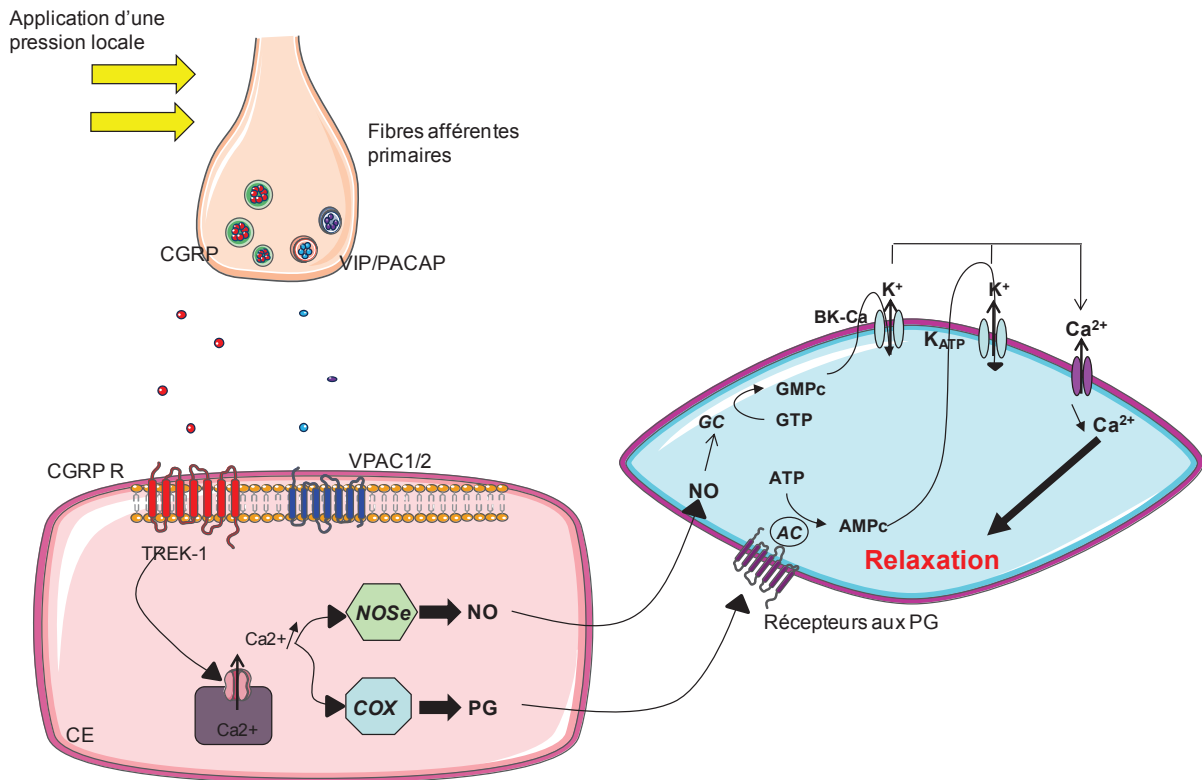


Figure 8. Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans la PIV (Fizanne et al. 2004; Fromy et al. 2000).

Dans un premier temps, le mécanisme de la PIV a été décrit comme un mécanisme purement périphérique mais des études antérieures ont démontré qu'il pouvait faire intervenir le système nerveux central (SNC). L'inactivation du SNC provoquée par une anesthésie profonde par l'isoflurane abolit la PIV chez le rat sain (Fizanne et al. 2003), suggérant la participation du système nerveux central. Cependant, en parallèle de cette abolition de la PIV, la réponse endothélium dépendante était aussi altérée. D'autres études ont montré que l'isoflurane peut agir directement sur la réactivité vasculaire via l'endothélium en inhibant la guanylate cyclase responsable de la synthèse du NO (Johns et al. 1995). Cette étude ne pouvait donc pas établir avec certitude la participation du SNC.

L'activation du SNC provoquée par un stimulus douloureux aigu (queue du rat dans de l'eau chaude à 50°C) entraînait également la perte de PIV sur le crâne à distance de l'application de la douleur (Fromy et al. 2007) avec en parallèle une augmentation de la sécrétion de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH). Dans cette étude, il a été émis l'hypothèse de l'action de circuits neuronaux « contrôles inhibiteurs diffus » (DNIC) bloquant le développement de la PIV. Ces circuits responsables du contrôle de la transmission

nociceptive via les fibres A et C, sont capables d'inhiber la perception tactile après un stimulus douloureux (Le Bars 2002).

Ces études suggèrent que la PIV n'est pas un mécanisme purement périphérique mais qu'une participation du SNC, en particulier la transmission sensorielle spinale serait nécessaire à son développement.

Les buts de ma thèse étaient de poursuivre la compréhension des mécanismes de la vasodilatation induite par la pression en conditions physiologiques. En particulier :

- *confirmer et préciser la participation des COX.*
- *identifier certains récepteurs cutanés.*
- *confirmer la participation d'une voie spinale sensorielle et préciser le rôle de certains récepteurs et canaux spinaux.*
- *démontrer la relation directe entre la perte de la PIV et l'augmentation de l'incidence d'escarres.*

2) Vasodilatation induite par le courant

L'utilisation accrue de l'iontophorèse pour tester le versant vasculaire de la microcirculation cutanée a montré l'existence d'une augmentation du flux sanguin cutané suite à l'application du courant même en absence de molécules vasoactives (Asberg et al. 1999; Droog et al. 2003; Grossmann et al. 1995). Cet effet vasculaire était retrouvé également dans d'autres cas de stimulation électrique comme la neurostimulation électrique transcutanée (Khalil et al. 2000).

La vasodilatation cutanée induite par l'application du courant galvanique est appelée CIV pour « current-induced vasodilation ». Cette vasodilatation a été perçue dans un premier temps comme une limite de l'utilisation de la iontophorèse pouvant interférer avec l'effet vasculaire des agents pharmacologiques administrés, soit une diminution de la réponse des molécules vasoconstrictrices, soit une surévaluation de l'effet réel des molécules vasodilatatrices (Morris et al. 1996). Afin de mieux appréhender sa participation dans les réponses vasodilatatrices iontophorétiques, de nombreuses études ont été menées chez l'homme (Durand et al. 2002a; Durand et al. 2002b; Durand et al. 2002c; Durand et al. 2002d; Durand et al. 2003; Rousseau et al. 2009; Rousseau et al. 2008; Tartas et al. 2005a; Tartas et al. 2005b; Tartas et al. 2004).

Ces études ont montré une différence d'amplitude et de cinétique entre la CIV anodale et cathodale (Durand et al. 2002a). En effet, l'amplitude de la vasodilatation au niveau de la cathode est plus importante que celle de l'anode pour une même durée de stimulation iontophorétique et la cinétique d'apparition de la cathode est plus rapide que celle de l'anode (Durand et al. 2002a).

En outre, cette vasodilatation au niveau de l'anode est proportionnelle à la durée d'application de courant pour des durées d'application de 1, 3 et 5 minutes contrairement à la cathode où cette proportionnalité est respectée uniquement jusqu'à 60 secondes (Durand et al. 2002a; Tartas et al. 2005b). Afin de réduire cette vasodilatation, l'application segmentée du courant a été suggérée. Or, chez l'homme la segmentation du courant a produit l'effet inverse : la vasodilatation obtenue après une application segmentée est plus grande qu'avec une application unique reflétant un phénomène d'amplification (Durand et al. 2002b; Tartas et al. 2005b). Cette amplification est supposée résulter d'un phénomène de sensibilisation des

fibres nerveuses par le courant électrique lors de la première application du courant (Durand et al. 2002b).

Sur le plan mécanistique, ces études cliniques ont permis de démontrer que la CIV est un mécanisme neurovasculaire de type « axone réflexe », impliquant les fibres nerveuses capsaïcino-sensibles quelque soit la polarité utilisée (Durand et al. 2002b). Par ailleurs, l'abolition de la CIV par l'aspirine est rapportée à la cathode et à l'anode (Berliner 1997b; Durand et al. 2002b; Tartas et al. 2005b). L'aspirine est un anti inflammatoire non stéroïdien agissant sur les COX. Ainsi les COX responsables de la synthèse de prostaglandines pourraient favoriser la CIV. Une étude a suggéré le rôle des COX-1 en démontrant que le célécoxib (inhibiteur de COX-2) n'induisait pas de modifications de la CIV (Tartas et al. 2005a). De plus, les COX sont exprimées dans une grande variété de tissus, y compris l'endothélium, les muscles lisses, les nerfs, et les plaquettes (Mustard et al. 1980). La réponse au courant a été observée jusqu'à 10 jours (2h, 10h, 3, 5, 7 et 10 jours) afin de déterminer le temps où la CIV réapparaîtrait après la prise d'aspirine (1g). Réapparue à partir de 7 jours, cette étude suggérait la participation des COX neuronales (Durand et al. 2003). En effet, des études ont montré qu'il fallait entre 24-36h à l'endothélium et aux cellules musculaires lisses pour résynthétiser les COX (Jaffe et al. 1979) alors que la synthèse des COX et d'autres protéines par les nerfs était le plus longue. Plus récemment, une autre étude a suggéré l'implication des COX plaquettaires chez l'homme (Rousseau et al. 2008).

En conclusion la CIV est un outil d'exploration neurovasculaire facile d'utilisation. Afin de poursuivre le modèle mécanistique de la CIV cathodale dans des conditions physiologique, les buts de ma thèse étaient de :

- ***Développer un modèle animal qui offre la possibilité d'utiliser des inhibiteurs spécifiques non utilisables chez l'homme.***
- ***Préciser les facteurs endothéliaux impliqués dans la CIV cathodale.***
- ***Identifier des canaux/récepteurs dans la CIV cathodale.***
- ***Vérifier le contrôle nerveux et en particulier la participation du SNC dans la CIV cathodale.***

Le chapitre 2 présente les différentes méthodes d'investigations pour mener à bien les buts de ma thèse.

CHAPITRE 2 :

Ce chapitre décrit les outils et les protocoles réalisés au cours de ma thèse regroupés dans différentes parties (fonctionnelle de la microcirculation in-vivo, étude de l'incidence d'escarre, exploration ex-vivo de la peau, exploration histologique de la peau et exploration fonctionnelle des fibres nerveuses).

Exploration fonctionnelle de la microcirculation cutanée *in vivo*

1) Outils

1.1) Fluxmétrie du laser Doppler

Le laser Doppler permet la mesure *in vivo* du flux sanguin cutané au repos et lors de tests fonctionnels ; son principe repose sur l'effet Doppler (Figure 9).

Le laser Doppler émet un faisceau hélium-néon monochromatique d'une longueur d'onde de 780 nm, de faible puissance (2 mW), suivant un régime continu. Le faisceau est dirigé sur la peau par des fibres optiques tandis qu'un système de photodétecteurs récupère la lumière rétro-diffusée. Le faisceau incident rencontrant une cellule sanguine en mouvement est réfléchi avec un décalage de fréquence proportionnel à la vitesse de la cellule heurtée. Les éléments immobiles du tissu modifient la direction du rayon mais non sa fréquence. La somme des décalages de fréquence induits par les globules rouges en mouvement représente le signal réfléchi. Son spectre est une courbe de Gauss, centrée par la fréquence incidente du faisceau et dont la largeur est proportionnelle à la vitesse moyenne des cellules sanguines. Une vasodilatation est observée par une augmentation du débit.

Le signal réfléchi est analysé et traité électroniquement. Parmi les paramètres recueillis, nous étudions le flux sanguin cutané appelé perfusion tissulaire exprimé en unité arbitraire (u.a).

Le principal avantage du débitmètre laser Doppler est sa résolution temporelle, son inconvénient est une faible résolution spatiale. Il permet de mesurer en continu la perfusion de la microcirculation sur un volume d'environ 1 mm³ situé en dessous de la sonde. La

débitmétrie laser Doppler permet de détecter des changements rapides de débit et d'obtenir une étude dynamique de ce dernier.

Ainsi, au niveau de la peau, la débitmétrie laser Doppler permet d'obtenir de manière non invasive une mesure continue et relative du débit de la microcirculation cutanée. Le temps de réponse ($<0.1s$) et la sensibilité du débitmètre laser Doppler permettent d'enregistrer des variations pulsatiles du débit microvasculaire.

Au cours de ma thèse, ce système d'analyse du flux sanguin cutané en temps réel a été utilisé dans les protocoles se référant à l'application d'une pression locale cutanée (PIV), après une stimulation électrique cathodale et des iontophorèses d'ACh et de SNP.

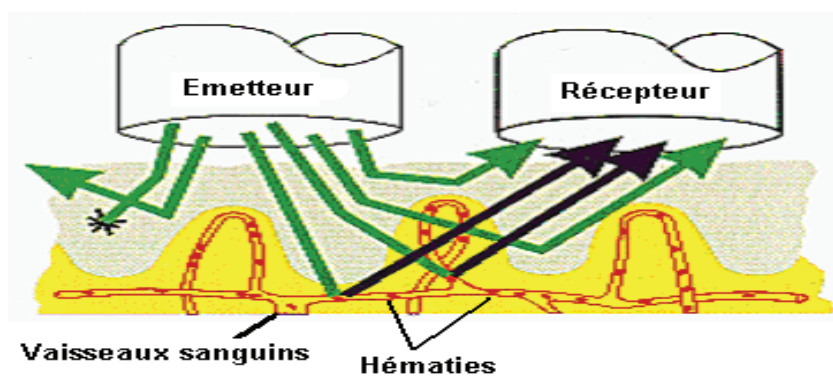


Figure 9. Principe du laser Doppler : un émetteur produit une lumière laser, une fois réfléchi sur les tissus la lumière laser est recueillie par un récepteur. Les flèches vertes correspondent à la lumière laser n'ayant pas subi d'effet Doppler et les flèches noires correspondent à la lumière laser ayant subi l'effet Doppler.

1.2) Iontophorèse

Comme la peau n'est pas une barrière imperméable, la technique de la iontophorèse est utilisée pour permettre la diffusion des solutions ionisées à travers la peau grâce à des stimulations électriques. L'avantage principal de cette technique est qu'elle permet la diffusion de molécule de manière non invasive. Le courant électrique est indispensable car il augmente la pénétration des molécules.

Cette technique utilise des courants de faible intensité (0.1mA) et leur application peut durer de quelques secondes à quelques minutes. Il est indispensable de connaître la polarité des molécules pharmacologiques avant chaque étude. Ainsi si la substance est chargée positivement, elle diffusera à travers la peau au niveau de l'anode (+) selon le principe de l'électrorépulsion des charges et inversement si elle est chargée négativement (Figure 10).

Couplée au laser Doppler, cette technique nous permet d'étudier simultanément les réponses vasculaires induites par l'utilisation de différentes molécules et de vérifier l'intégrité de la fonction vasodilatatrice dans la microcirculation cutanée.

Au cours de ma thèse, ce système couplé au laser Doppler a été utilisé dans les protocoles se référant à l'application d'une stimulation électrique cathodale (CIV) et des iontophoreses d'ACh et de SNP.

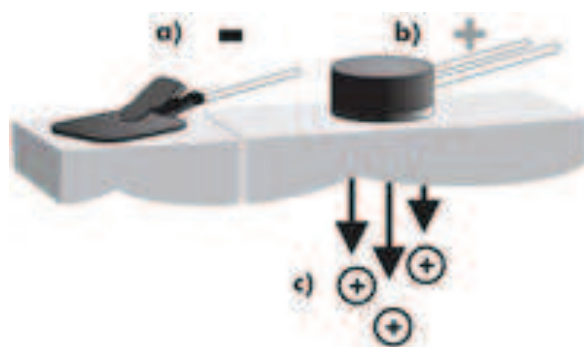


Figure 10. Couplage iontophorèse –laser Doppler en anodal. a) patch de référence, b) sonde de iontophorèse.

2) Protocoles in vivo chez le rat anesthésié

2.1) Etude de la vasodilatation induite par une pression locale

La variation du flux sanguin cutané en réponse à l'application progressive d'une pression locale non nociceptive a été évaluée au niveau de la cuisse et du crâne chez le rat anesthésié préalablement depilé 48h avant à l'Isotrurane. Le flux sanguin de la microcirculation cutanée a été mesuré grâce à une sonde laser Doppler (PF801, Periflux Perimed, Suède) à l'endroit même de l'application de la pression grâce à un système spécialement conçu à cet effet, évitant toute intervention directe de l'expérimentateur (Figure 11).

La structure de base de ce système est un balancier comprenant un axe cylindrique en aluminium (le fléau). A l'une des extrémités sont disposés une sonde laser Doppler et un récipient cylindrique en plastique (réservoir qui se remplit d'eau). A l'autre extrémité un contrepoids de quinze grammes, mobile le long de l'axe, permet d'équilibrer le fléau et de le maintenir à l'horizontal. Le système est préalablement calibré afin d'obtenir une relation linéaire entre le volume d'eau remplissant le récipient et la pression appliquée à la surface de la peau. La pression appliquée sur la peau de l'animal est augmentée progressivement de 11,1 Pa/s pendant 20 minutes (Abraham et al. 2001).

Dans ces études, le flux sanguin cutané, la température cutanée BAT-12 et la pression artérielle systolique (PAS) sont enregistrés sur un ordinateur grâce à un système d'acquisition BIOPAC (Systems INC, Santabarbara, California, USA).l'application de la pression.

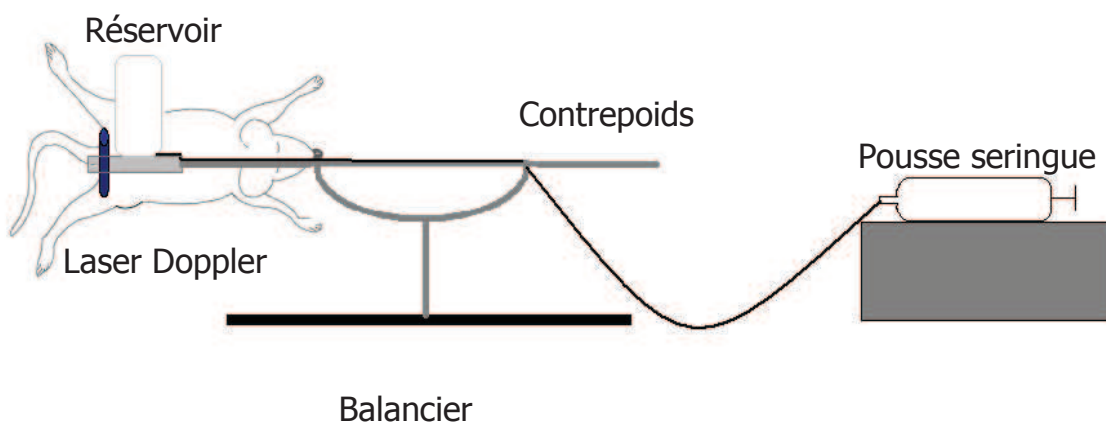


Figure 11. Schéma du dispositif utilisé pour exercer une pression calibrée progressive sur la peau.

Dans nos études, les résultats de la PIV sont présentés de deux façons différentes : en valeurs brutes (u.a) associées avec une courbe dans le temps ou en pourcentage de vasodilatation par rapport au niveau de base associé avec des histogrammes (Calcul de la $PIV = ((\text{valeur maximale en unité arbitraire} - \text{valeur de base en u.a}) / (\text{valeur de base en u.a}) \times 100)$).

2.2) Etude de la vasodilatation induite par le courant

Afin d'appliquer un courant cathodal ou anodal de 100 μA , un stimulateur électrique (PF 382b Perilont Power Supply, Perimed, Stockholm, Suède) est utilisé. Sur la patte avant de l'animal, un patch de référence est relié à une pince. L'autre pince quant à elle est fixée sur la sonde de iontophorèse (481-1, Perimed, Jarfalla, Swenden) en respectant la polarité à utiliser.

Couplé à cette sonde de iontophorèse, un laser Doppler (Periflux 4001 Master, PERIMED, Suède) permet de visualiser simultanément les effets de différentes stimulations sur la microcirculation.

Nous avons utilisé de l'eau désionisée dépourvue de charge électrique afin d'étudier spécifiquement la vasodilatation induite par le courant cathodal (240s ; 100 μA). Ce courant est capable d'induire à lui seul une vasodilatation neurovasculaire appelée CIV.

2.3) Etude de la vasodilatation dépendante de l'endothélium

La vasodilatation endothélium-dépendante a été testée par l'administration iontophorétique d'ACh 2 % à l'aide d'un courant anodal (20s ; 100 μA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Aucune vasodilatation aspécifique n'est présente chez le rat avec l'utilisation de cette stimulation anodale.

2.4) Etude de la vasodilatation indépendante de l'endothélium

La vasodilatation endothélium-indépendante c'est-à-dire la relaxation du muscle lisse vasculaire en réponse à un donneur exogène de NO, a été testée par l'administration iontophorétique de SNP 2 % à l'aide d'un courant cathodal (20s ; 100 μA) (Sigma-Aldrich,

Steinheim, Germany). Aucune vasodilatation aspécifique n'est présente chez le rat avec l'utilisation de cette stimulation cathodale.

Etude de l'incidence d'escarres

1) Outils : l'aimant et le laser Doppler Imageur

Pour étudier l'incidence d'escarres sur animaux, une ischémie prolongée sur la peau de l'animal grâce à l'application d'un aimant de 11 kPa est effectuée sur une surface de 177mm² (Figure 12).

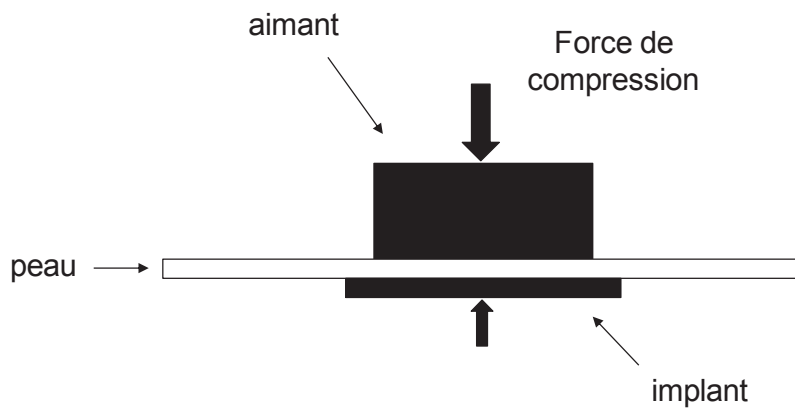


Figure 12. Schéma de l'aimant et du dispositif implanté sous la peau créant des lésions ischémie-reperfusion (Peirce et al. 2000).

Après avoir réalisé une ischémie prolongée sur la peau des rats, un système de lecture du flux sanguin cutané a été utilisé.

Le système PeriCam PSI est un laser imageur de perfusion sanguine basé sur la technologie d'analyse de contraste du laser Speckle (LASCA). C'est une méthode qui visualise la perfusion sanguine du tissu en temps réel. LASCA fournit de nouveaux moyens d'étudier la microcirculation inaccessible dans le passé. Le système PeriCam PSI permet de combiner la réponse dynamique et la résolution spatiale dans un seul instrument, fournissant les graphiques en temps réel et les enregistrements visuels du centre d'intérêt. Des réponses obtenues par le laser imageur sont enregistrées directement sur un ordinateur et les images dynamiques de la perfusion sanguine sont analysées en utilisant le logiciel PIMsoft (PERIMED, Suède).

Au cours de ma thèse, la réalisation d'une ischémie prolongée et le système d'analyse du flux sanguin cutané en temps réel et en dynamique ont été utilisés dans les protocoles se référant à l'application d'aimant sur la peau de l'animal ainsi que la visualisation de lésions ischémiques.

2) Protocole

48h avant l'expérimentation, l'animal est dépilé au niveau du dos afin d'avoir une peau dépourvue de poils pour la chirurgie sous anesthésie générale par isoflurane.

Une incision transversale est faite au niveau de la peau du dos. Préalablement désinfecté (bétadine), l'implant en acier est ensuite glissé sous la peau entre le muscle et l'hypoderme au niveau des cuisses. Une suture de Polyflon de la taille 2/0 (Peters chirurgical, France) a permis de refermer l'incision. Aucun bandage n'a été utilisé et les rats sont remis en cage individuelle afin d'améliorer leur cicatrisation (Figure 13).

Après une période de rétablissement de 48 heures, les animaux sont soumis à un protocole de compression de la peau pendant 6 heures. Un cycle de 6 heures est réalisé sur les animaux vigiles libres de leur mouvement dans leur cage.

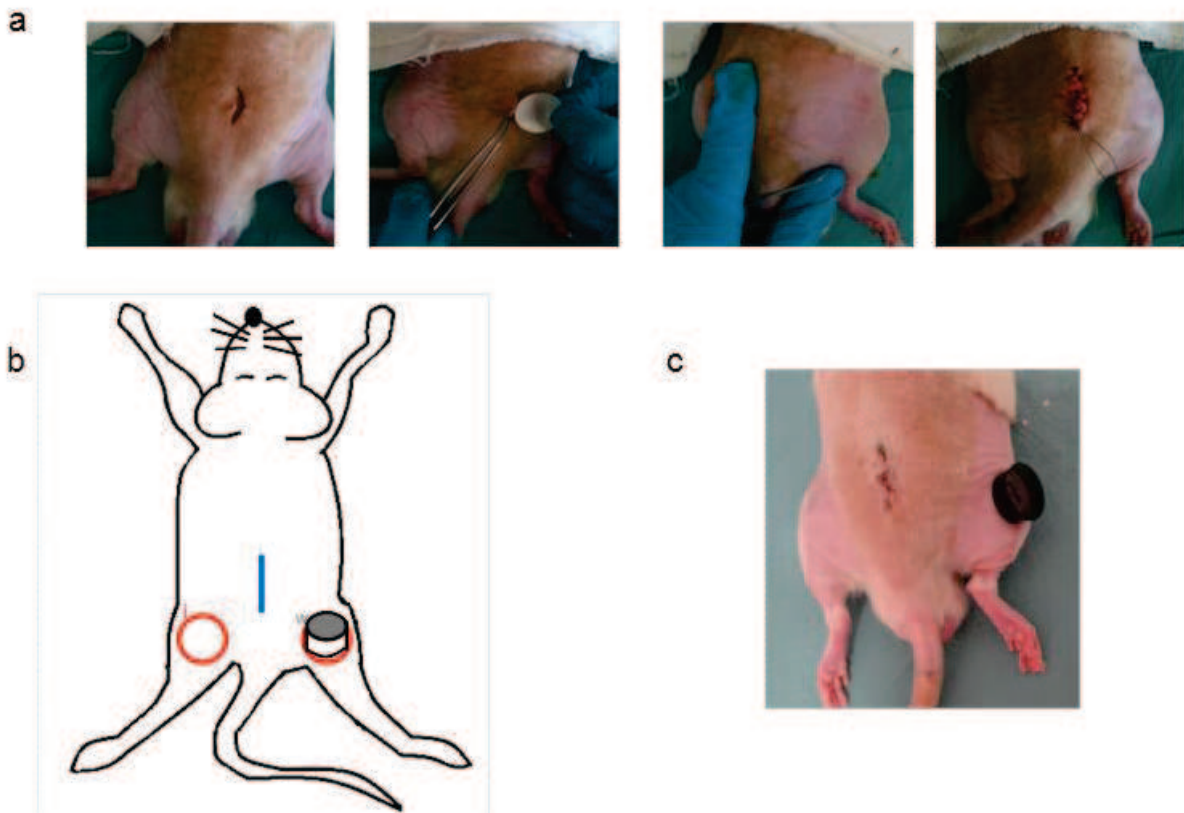


Figure 13. Représentation schématique et photographies de la technique de dispositif implanté et du dispositif de compression cutanée.

- (a) Photographie représentant les étapes de l'insertion du dispositif implanté après avoir incisé la peau.
- (b) La ligne bleue indique l'incision dorsale permettant la mise en place des implants de 20mm de diamètre en sous cutané (i=cercle rouge) ainsi que l'emplacement de l'aimant (w) sur les implants permettant la compression de la peau.
- (c) Photographie du dispositif de compression cutanée chez le rat après les injections intrathécales de saline, bupivacaïne et capsazépine chez le rat.

Le laser Doppler imageur Speckle est utilisé afin de lire le flux sanguin cutané sur la zone compressée durant toute l'expérimentation, dès le retrait de l'aimant et jusqu'à 24h après.

L'ischémie est caractérisée dans notre étude par une valeur de LSCI inférieur à 50u.a. visualisée par le laser imageur Speckle.

La nécrose du tissu cutané est caractérisée par une lésion à 24h (photos macroscopiques) et par une désorganisation de l'épiderme et du derme (coupes histologiques).

Exploration *ex vivo* de la peau

1) Outils

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite à l'aide d'un substrat capable d'induire une réaction enzymatique colorée via une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (Figure 14). Dans notre étude, l'utilisation de cette technique a été intéressante afin de quantifier les prostacyclines libérées lors de la CIV. Les prostacyclines ne sont pas stables mais il existe un métabolite stable le 6 keto-PGF1 α qui est le reflet de la quantité de prostacyclines libérées.

Au cours de ma thèse, cette technique a été utilisée dans le cadre des études se référant à la compréhension des mécanismes sous-jacents impliqués dans la CIV cathodale.

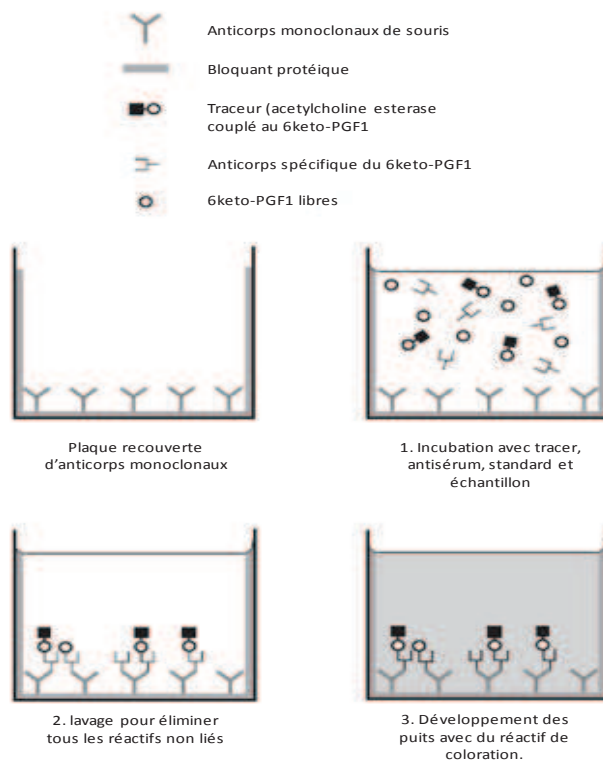


Figure 14. Schéma du dosage du 6 keto PGF1 α par ELISA.

2) Protocole

Les dosages ELISA ont été réalisés à partir d'échantillons de peau (environ 60mg) prélevés sur les cuisses de l'animal anesthésié à l'aide d'un punch (8mm de diamètre). Différentes conditions ont été réalisées 240s après le début de la stimulation correspondant à la vasodilatation maximale. Des échantillons ont été réalisés sous différents bloqueurs et chaque échantillon de peau a été instantanément congelé en azote liquide et maintenu à -80°C. Chaque échantillon congelé de peau est placé dans un tube en verre avec 250 ml de solution saline tamponnée de paraformaldehyde (PAF) contenant 100 mg/ml d'indométacine pour empêcher la synthèse des prostaglandines due à la réalisation du punch. Le tube est placé dans de la glace et le tissu est broyé à l'aide d'un Potter en verre. Après centrifugation (2,000g pendant 10 minutes à 4 °C), le 6 keto-PGF1 α a été dosé dans le surnageant en utilisant le kit ELISA 6 keto-PGF1 α (Cayman Chemical). L'absorbance des échantillons et de la courbe standard correspondante sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre de microplate PowerWave XS à 410 nm.

Exploration histologique de la peau

1) Outils

L'histologie cutanée est l'étude de l'anatomie microscopique des cellules et des tissus cutanés. Pour avoir un examen histologique correct, la qualité du prélèvement, le choix de la localisation et la taille du fragment sont fondamentales.

C'est un examen réalisé sur des tranches fines de tissu sous un microscope optique après fixation des tissus au formol, le temps de fixation dépend bien entendu de l'épaisseur du prélèvement. Cette technique permet de plus une bonne conservation des composants du tissu. Après avoir fixé les tissus, les prélèvements sont inclus dans la paraffine puis coupés en coupes fines. Après avoir été coupés en fines tranches, les coupes ont été colorées à l'aide d'hématoxyline-éosine-safran. Cette coloration permet de visualiser ou d'identifier les différentes structures microscopiques (épiderme, derme et hypoderme). Aujourd'hui, c'est la coloration de base pour les coupes histologiques. Les noyaux des cellules sont colorés en bleu-violet et le cytoplasme en rose. Le tissu conjonctif est en jaune orangé.

Dans notre cas, cette technique a été utilisée dans le cadre des études se référant à l'étude des lésions ischémiques après compression prolongée.

2) Protocole

Les échantillons de tissu de peau sont excisés directement sous les emplacements de la compression et en controlatéral pour une surface de 1.77cm² chez des rats anesthésiés. Ces échantillons sont ensuite placés dans des cassettes pour conserver l'horizontalité de la peau. Tous les échantillons ont été ensuite fixés dans une solution de formol neutre. Après une nuit, les échantillons de peau fixés ont été coulés en paraffine. Des sections de peau (5 µm) ont été réalisées à l'aide d'un microtome et une coloration avec de la hématoxyline-éosine-safran a été faite. Les coupes histologiques ont été visualisées à l'aide d'un microscope optique afin d'identifier l'œdème et la filtration monocytaire (reflet de l'inflammation).

Exploration fonctionnelle des fibres nerveuses

L'exploration fonctionnelle des fibres nerveuses se fait à l'aide de tests comportementaux sur animaux vigiles. Différentes stimulations (mécanique et thermique) sont utilisées correspondant à l'étude des différentes fibres nerveuses ou nocicepteurs mécaniques et thermiques.

1) Test thermique nociceptif: Tail Flick

Le test du Tail Flick est utilisé pour évaluer la sensibilité à la douleur des animaux. La queue de l'animal est soumise à une source de chaleur rayonnante produite par une lampe halogène. Une cellule photo-électrique réglable détecte le mouvement brusque de la queue ("Tail Flick") et le temps de latence est alors automatiquement affiché en dixième de seconde dans l'unité de contrôle. Une latence maximale de 10 secondes a été fixée pour éviter d'endommager les tissus (Figure 15).

Ce test permet d'étudier l'intégrité des fibres afférentes primaires de type C. Ce test a un contrôle « spinal » car il active des zones de douleur réflexe présente au niveau de la moelle épinière (Le Bars et al. 2001).



Figure 15. Etude de la sensibilité thermique nociceptive : Tail Flick

2) Test mécanique nociceptif : Randall Selitto

Une force mécanique graduelle fournie par l'intermédiaire du dispositif de Randall Selitto (ALMEMO 2390-5, AHLBORN, WOODLAND HILL CA) est appliquée sur les pattes arrières droite et gauche de l'animal. Lorsque le rat retire sa patte ou vocalise, le seuil de douleur de l'animal est enregistré en grammes (Figure 16).

Ce test permet d'étudier l'intégrité des fibres afférentes primaires de type $A\delta$ et C (Le Bars et al. 2001).



Figure 16. Etude de la sensibilité mécanique nociceptive : Randall Selitto.

3) Test mécanique nociceptif : Von Frey

Utilisé avec des filaments flexibles, ce test correspond à la sensibilité tactile reposant sur les fibres $A\beta$. Largement utilisé chez l'homme, ce test est adapté à l'animal avec l'utilisation de cônes rigides. Dans ce cas, le rat est placé dans une boîte où il peut se déplacer librement. Le cône rigide est mis en contact avec la surface plantaire des pattes arrières droite et gauche de l'animal puis une force croissante y est exercée. La force débute sous le seuil de perception de l'animal et augmente jusqu'à ce que l'animal retire sa patte. La réponse du rat, réflexe de retrait de la patte, est automatiquement mesurée en grammes à l'aide d'un appareil spécial (ALMEMO 2390-5, AHLBORN, WOODLAND HILL CA) (Figure 17).

Utilisé avec des cônes rigides, ce test permet d'étudier l'intégrité des fibres afférentes primaires de type $A\delta$ et C (Vivancos et al. 2004).



Figure 17. Etude de la sensibilité mécanique nociceptive : Von Frey.

Ces trois tests comportementaux nous permettent de vérifier l'intégrité du versant nerveux.

CHAPITRE 3 :

Le chapitre 3 présente mon travail personnel réalisé au long de la thèse en deux grandes parties : 1) les études relatives à la PIV en relation avec l'augmentation de l'incidence d'escarres et 2) les études relatives à la CIV cathodale chez le rat.

Travail personnel

1) La PIV

La vasodilatation induite par la pression et l'implication des COX-1

Introduction

Les études précédentes sur la PIV se sont principalement intéressées à la description du mécanisme en périphérie. La PIV est décrite comme un mécanisme non nociceptif neurovasculaire impliquant les fibres primaires capsaïcino-sensibles et les facteurs endothéliaux (NO et les prostaglandines). En effet, une étude a montré que la PIV était réduite sous indométacine (réduction de la PIV de 65%) (Fromy et al. 2000). L'indométacine est un bloqueur non spécifique des cyclooxygénases (COX). Or, la famille des COX possède deux isoformes, les COX-1 et les COX-2. La COX-1 est dite constitutive c'est-à-dire avec une concentration stable dans l'organisme et ubiquitaire. Elle joue des rôles de protections physiologiques au niveau de l'estomac, du rein et de l'endothélium. En revanche, la COX-2 est dite inductible car sa synthèse fait suite à des stimuli de types inflammatoires (Meade et al. 1993).

Aucune étude n'avait été réalisée afin de déterminer quel type de COX est responsable de la synthèse de prostaglandines dans la PIV.

But de l'étude

Préciser les COX impliquées dans le mécanisme de la PIV en conditions physiologiques.

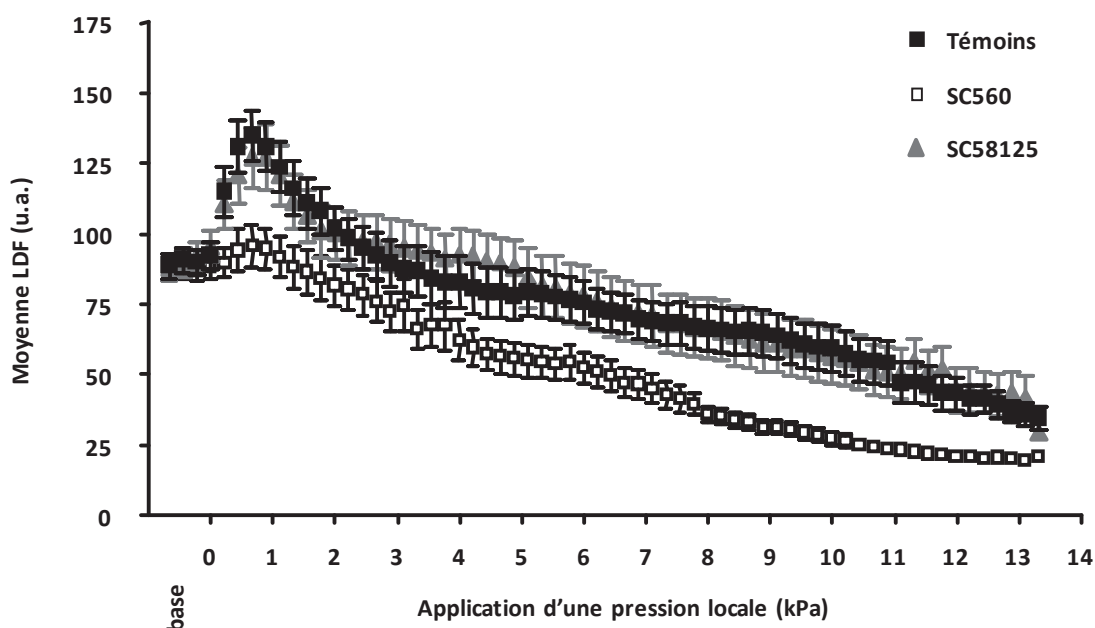
Matériels et méthodes spécifiques à cette étude

Cette étude a été réalisée chez des rats Wistar mâles d'environ 7 à 11 semaines. Des injections intraveineuses en fémorale de SC560 (inhibiteur spécifique de COX-1, 2.5mg/kg), de SC58125 (inhibiteur spécifique de COX-2, 5mg/kg) ont été réalisées chez les rats anesthésiés.

Pour étudier la PIV, l'application locale d'une pression progressive (11.1Pa/s) a été effectuée sur la cuisse des rats sains anesthésiés.

Résultats

A



B

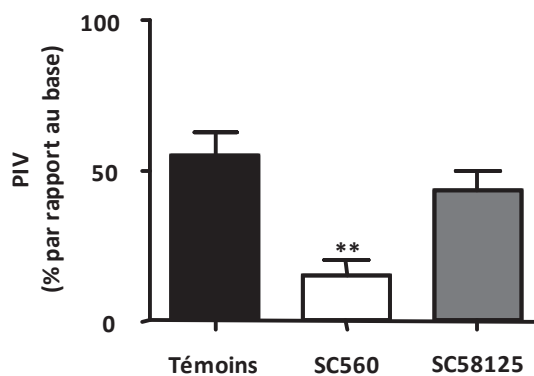


Figure 18. (A) Evolution temporelle du flux sanguin cutané en réponse à l'application d'une pression locale de 11.1Pa/s sur la cuisse chez les rats témoins recevant un solvant (sérum physiologique, i.v., n=10) et les rats traités avec un inhibiteur spécifique de COX-1 (SC560, 2.5mg/kg, i.v., n=10) ou un inhibiteur spécifique de COX-2 (SC58125, 5mg/kg, i.v., n=10). (B). Histogramme représentant la moyenne \pm SEM de l'amplitude maximale de la PIV en réponse à l'application d'une pression locale sur la cuisse de 11.1Pa/s chez les rats témoins

recevant un solvant (sérum physiologique, i.v., n=10) et traités avec un inhibiteur spécifique de COX-1 (SC560, 2.5mg/kg, i.v., n=10) ou un inhibiteur spécifique de COX-2 (SC58125, 5mg/kg, i.v., n=10).** P<0.01 vs témoins (One-Way ANOVA avec post test Dunett).

En réponse à l'application de la pression chez les rats témoins, le flux sanguin cutané a augmenté de 90±4 u.a au repos à une valeur maximale de 139±10 u.a (P<0.001) pour une pression locale de 0.64±0.06 kPa, représentant une PIV de 55±8%.

A l'inverse, chez les rats traités au SC560, le flux sanguin cutané a augmenté de 88±5 u.a au repos à une valeur maximale de 101±7 u.a (P<0.05) pour une pression locale de 0.72±0.15 kPa, représentant une PIV de 15±5%.

Chez les rats traités au SC58125, le flux sanguin cutané a augmenté de 91±5 u.a au repos à une valeur maximale de 131±12 u.a (P<0.001) pour une pression locale de 0.70±0.07 kPa, représentant une PIV de 43±6%.

L'inhibiteur de COX-1 (SC560) a réduit la PIV de 73%, alors que l'inhibiteur des COX-2 (SC58125) n'a pas modifié la PIV (Figures 18 A et B).

De plus, les inhibiteurs SC560 et SC58125 n'ont pas modifié les réponses à l'ACH (témoins : 70±7% ; SC560 : 61±13% ; SC58125 : 72±7%, P>0.05 (One-Way ANOVA avec post test Dunett).

Discussion

Dans notre étude, la vasodilatation induite par la pression est réduite par l'inhibiteur des COX-1, mais inchangée par l'inhibiteur des COX-2.

Cette étude montre clairement la contribution de la voie COX-1 dans la PIV chez l'animal sain. En accord avec nos résultats, COX-1 est une enzyme majoritairement décrite dans les mécanismes physiologiques. Ainsi, l'expression constitutive de COX-1 dans les sites épithéliaux lors de la réparation de la peau est retrouvée principalement dans la peau saine (Kampfer et al. 2003). A l'inverse, COX-2, non impliquée dans la PIV, est rarement retrouvée dans la peau saine (Kampfer et al. 2003; Leong et al. 1996). Cette enzyme est surtout présente dans le cas de lésions cutanées (par exemple induites par grattage mécanique) et il est démontré qu'elle participe principalement à l'inflammation dans ce type de lésions (Mantyh et al. 2002; Sugimoto et al. 2006). De plus, comme les COX-1 sont colocalisées avec les PGIS dans les cellules endothéliales et pas les COX-2 (Liou et al. 2000), nous émettons l'hypothèse que la PIV suit la voie des COX-1/PGIS/PGI2/IP et reposerait majoritairement sur la production de prostacyclines. Cette hypothèse reste à vérifier.

Conclusion

En conditions physiologiques, la PIV repose en partie sur les prostaglandines produites via la voie des COX-1.

La vasodilatation induite par la pression et l'implication des canaux TRPV1 et des récepteurs CGRP cutanés

Introduction

Un traitement néonatal à la capsaïcine a aboli la PIV démontrant la participation des fibres capsaïcino-sensibles dans la PIV (Fromy et al. 2000). Des études ont prouvé que ces fibres possédaient de nombreux canaux dont le plus étudié est le TRPV1 (Transient receptor potential Vanilloid 1). Les récepteurs TRPV1 font partie de la famille des TRP (Transient receptor potential) et sont considérés comme des nocicepteurs c'est-à-dire activés par la douleur. Cette famille de récepteurs est sensible aux stimuli mécaniques, thermiques, aux protons et à certaines substances chimiques comme la capsaïcine. Les TRP sont classés en six groupes : TRPM, TRPA, TRPC, TRPML, TRPN, TRPP et TRPV. Les TRPV étant eux-mêmes répartis en cinq classes (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, ET TRPV5). TRPV1 appartient à la grande famille des canaux ioniques des TRP. Isolés et clonés en 1997 (Caterina et al. 1997), les TRPV1 sont localisés sur les fibres nerveuses sensorielles dans les régions épidermique et dermique mais aussi autour des vaisseaux sanguins et des follicules pileux (Axelsson et al. 2009).

De plus, ces fibres nerveuses sont capables de libérer divers neuropeptides tel que le CGRP. Une étude pharmacologique a montré le rôle de CGRP mais pas des neurokinines dans la PIV. Cependant, puisque les antagonistes avaient été administrés par voie veineuse (Fromy et al. 2000), l'implication des récepteurs au CGRP au niveau cutané n'avait pas été démontrée.

En conclusion, TRPV1 et CGRP sont colocalisés sur les fibres nerveuses sensorielles présentes dans la peau chez le rat adulte (Guo et al. 1999), et également dans le derme et l'hypoderme chez la souris (Funakoshi et al. 2006) et l'homme (Stander et al. 2004). Leurs rôles associés à divers stimuli entraînent l'activation des TRPV1 dans les fibres nerveuses cutanées capable d'induire par la suite le relargage de CGRP (Petho et al. 2004). C'est pourquoi, nous émettons l'hypothèse que TRPV1 et CGRP pourraient être impliqués au niveau cutané dans la PIV.

But de l'étude

Préciser l'implication des canaux/ récepteurs TRPV1 et CGRP au niveau cutané dans la PIV en conditions physiologiques.

Matériels et méthodes spécifiques à cette étude

Cette étude a été réalisée chez des rats Wistar mâles d'environ 7 à 11 semaines. Des injections sous-cutanées de capsazépine (inhibiteur spécifique des TRPV1, 3mg/kg) et de CGRP8-37 (inhibiteur spécifique des récepteurs du CGRP, 100µg/kg) ont été réalisées sur le crâne au point d'application de la pression afin de bloquer ces canaux/ récepteurs cutanés. Pour étudier la PIV, une pression de 11.1 Pa/s a été appliquée sur la cuisse des rats sains anesthésiés. L'effet des inhibiteurs a été étudié en comparaison de l'injection s.c. de leur solvant respectif (DMSO (diméthylsulfoxyde) pour la capsazépine et sérum physiologique pour le CGRP.

Résultats

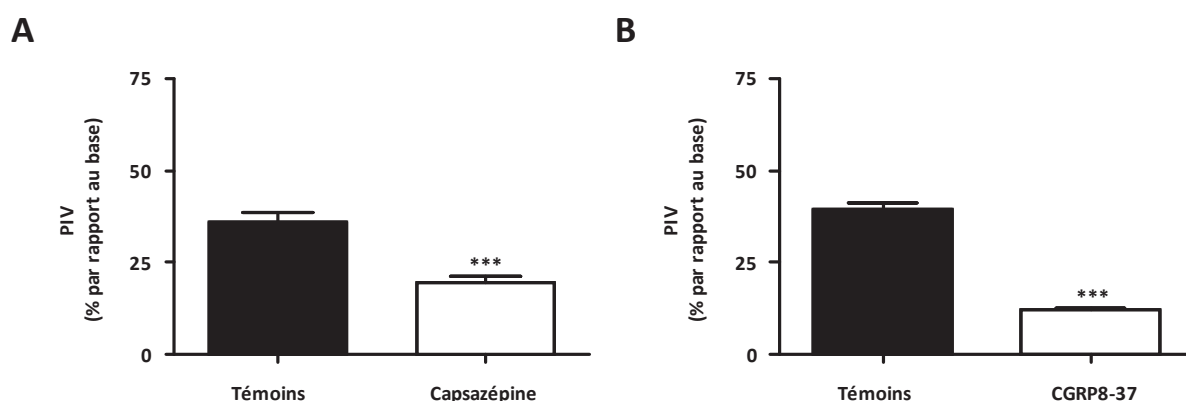


Figure 19. (A) Histogramme représentant la moyenne \pm SEM de l'amplitude maximale de la PIV en réponse à l'application locale d'une pression locale (11.1 Pa/s) sur le crâne des rats témoins (DMSO 45%, s.c., n=10) et traités avec un inhibiteur spécifique des TRPV1 (capsazépine, 3mg/kg, s.c., n=10). *** P<0.001 vs témoins. t-test non apparié.

(B) Histogramme représentant la moyenne \pm SEM de l'amplitude maximale de la PIV en réponse à l'application locale d'une pression (11.1Pa/s) sur le crâne des rats témoins (sérum physiologique, s.c., n=10) et traités avec un inhibiteur des récepteurs au CGRP (CGRP8-37, 100µg/kg, s.c., n=10). *** P<0.001 vs témoins (t-test non apparié).

Implication des canaux TRPV1 cutanés dans la PIV

En réponse à l'application de la pression chez les rats témoins (DMSO), le flux sanguin cutané a augmenté de 65 ± 3 u.a au repos à une valeur maximale de 88 ± 4 u.a ($P < 0.001$), représentant une PIV de $36 \pm 3\%$.

Chez les rats traités (capsazépine), le flux sanguin cutané a augmenté de 73 ± 4 u.a au repos à une valeur maximale de 88 ± 5 u.a ($P < 0.001$) en réponse à la pression, représentant une PIV de $20 \pm 2\%$.

L'inhibiteur des TRPV1 (capsazépine) injecté en sous cutané a donc réduit la PIV de 45% ($P < 0.001$) (Figure 19A).

Implication des récepteurs CGRP cutanés dans la PIV

En réponse à l'application de la pression chez les rats témoins (sérum physiologique), le flux sanguin cutané a augmenté de 83 ± 4 u.a au repos à une valeur maximale de 116 ± 5 u.a ($P < 0.001$), représentant une PIV de $39 \pm 2\%$.

Chez les rats traités (CGRP8-37), le flux sanguin cutané a augmenté de 84 ± 2 u.a au repos à une valeur maximale de 94 ± 2 u.a ($P < 0.001$) en réponse à la pression, représentant une PIV de $12 \pm 1\%$.

L'inhibiteur des récepteurs au CGRP (CGRP8-37) injecté en sous cutané a donc réduit la PIV de 70% ($P < 0.001$) (Figure 19B).

Discussion

La réduction de la PIV par la capsazépine et le CGRP8-37 injectés en sous cutané chez le rat sain indique que les TRPV1 cutanés et les récepteurs au CGRP cutanés participent à la PIV en conditions physiologiques.

Le premier antagoniste des TRPV1 a pu être découvert et appelé « capsazépine » (Walpole et al. 1994). Cet antagoniste compétitif bloque l'entrée du courant de calcium induite par la capsaïcine et agit principalement sur des canaux ioniques TRPV1 in vitro en électrophysiologie (Bevan et al. 1992). La capsazépine est en effet capable de réduire les réponses de vasodilatation et d'hyperalgésie induites par la capsaïcine (Kwak et al. 1998;

Perkins et al. 1992). En accord avec cette relation capsaïcine/TRPV1, nos résultats démontrent que la PIV, dépendante des fibres capsaïcino-sensibles (Fromy et al. 1998; Fromy et al. 2000), fait intervenir les TRPV1 cutanés.

L'implication du CGRP dans la PIV était connue depuis 2000 mais cette étude permet de préciser que ce sont les récepteurs cutanés qui sont impliqués. Le CGRP en périphérie est situé sur les fibres C et A δ étroitement associées aux vaisseaux sanguins (Brain et al. 2004). Ainsi, le CGRP est un puissant vasodilatateur des vaisseaux cutanés (Hughes et al. 1991) et ses effets peuvent être antagonisés par le CGRP8-37 (Escott et al. 1993; Kato et al. 1996). Des études ont en effet montré que l'administration de CGRP8-37 est capable de bloquer certaines réponses vasodilatatrices comme dans le cas d'injection intradermique de CGRP et de capsaïcine in vitro et in vivo (Chu et al. 2001; Hughes et al. 1991; Rinder et al. 1996). Injecté au niveau cutané, le CGRP8-37 peut aussi inhiber la vasodilatation et l'œdème après une irradiation aux UV chez le rat (Benrath et al. 1995). En accord avec ces études, les récepteurs CGRP cutanés sont impliqués dans la PIV sensible à la capsaïcine.

La capsazépine est capable de bloquer le relargage du CGRP présent dans les fibres afférentes primaires lors d'une diminution de pH (Franco-Cereceda et al. 1993). Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que sous le blocage des TRPV1, la diminution de la PIV n'était pas liée à la diminution de la libération du CGRP.

Conclusion

Les TRPV1 et les récepteurs au CGRP cutanés participent à la PIV en conditions physiologiques.

La vasodilatation induite par la pression, la transmission spinale nociceptive et l'incidence d'escarres

Introduction

Les escarres représentent un problème de santé sérieux pour les patients et un fardeau financier pour les services de santé. Les facteurs de risques associés à l'incidence d'escarres ont été identifiés et répertoriés dans des échelles de scores mais il reste des éléments à éclaircir. Le manque d'activité et de mobilité, l'incontinence, les problèmes alimentaires, le diabète, le vieillissement, et les neuropathies sont les facteurs de risques le plus souvent rapportés dans les escarres. La présence d'escarres est souvent associée à l'immobilité mais la perte de sensibilité nerveuse et sensorielle peut avoir des conséquences dramatiques.

La PIV a été définie comme mécanisme protecteur de la peau vis-à-vis des pressions exercées sur la peau et donc limiterait l'ischémie tissulaire et par conséquent la présence d'escarres chez les sujets sains. Dans le cas du diabète et du vieillissement, l'hypothèse d'une relation étroite entre l'absence de PIV et d'incidence élevée d'escarres dans ces deux populations décrites comme étant à risque a été suggérée. Cependant, aucune étude n'a montré directement cette relation.

Deux études expérimentales ont suggéré que le SNC avait un rôle dans le développement de la PIV (Fizanne et al. 2003; Fromy et al. 2007). Par ailleurs, une étude chez des patients paraplégiques a confirmé que la transmission spinale était indispensable au maintien de la PIV (résultats non publiés). En accord avec ces résultats, cette transmission spinale intervient et est indispensable dans les mécanismes douloureux provoqués en périphérie. La littérature rapporte des problèmes au niveau des réponses vasculaires allant jusqu'aux lésions ischémiques dans le cas d'une perte de cette transmission spinale comme dans les cas de paraplégies ou d'anesthésies profondes (Chen et al. 2005; Lindgren et al. 2005).

De plus, l'étude des voies spinales peut se faire grâce à des modèles chroniques de lésions de moelle épinière chez le rat, largement utilisés comme modèle expérimental de paraplégie (facteur de risque d'escarres). Cependant, les lésions chroniques de la moelle épinière induisent des modifications structurales de la peau en périphérie. La peau devient plus rigide et des altérations vasculaires sont observées (Deitrick et al. 2007). Pour montrer le rôle de la

transmission sensorielle spinale dans le développement de la PIV, nous avons réalisé un blocage pharmacologique aigu de la moelle épinière à l'aide d'injections intrathécales. Ceci nous permet de conserver les capacités intactes de la peau au point d'application de la pression et d'écarter toute modification périphérique.

La PIV est médiée par les fibres afférentes primaires, or la majorité de ces fibres atteignent le système nerveux central par les racines rachidiennes postérieures ou par les ganglions dorsaux. Ces fibres afférentes primaires sont souvent associées aux récepteurs TRPV1 largement étudiés depuis leur clonage (Caterina et al. 1997). Des études ont mis en évidence que ce canal/récepteur était retrouvé à la fois en périphérie, au niveau des DRG et au niveau pré et post-synaptique (Luo et al. 2004; Yu et al. 2008). TRPV1 est majoritairement retrouvé dans la transmission de la nociception. En périphérie, TRPV1 peut être activé par les protons, la capsaïcine, la température et d'autres stimuli nociceptifs. Au niveau spinal, une fois activé, il permet l'entrée de Ca^{2+} et Na^{+} dans les terminaisons des fibres nerveuses afférentes. Ceci va entraîner leur dépolarisation et la conduction du message douloureux jusqu'aux DRG via la libération du glutamate au niveau spinal. A ce niveau, les TRPV1 spinaux contribuent par exemple aux réponses vasodilatatrices cutanées de l'inflammation neurogénique induites par une injection intradermique de capsaïcine qui peuvent être bloquées par des injections intrathécales de capsazépine chez le rat (Lin et al. 2007)

La transmission des messages nociceptifs périphériques grâce aux fibres afférentes primaires jusqu'aux neurones spinaux se fait par deux groupes principaux de substances. Les acides aminés excitateurs (le glutamate) qui sont les neurotransmetteurs, et les neuropeptides (CGRP, SP, neurokinines A et B...) qui modulent les effets des premiers. La libération de ces substances se fait par exocytose des vésicules synaptiques, qui est déclenchée par l'arrivée de Ca^{2+} dans les terminaisons spinales des fibres afférentes primaires. Des études récentes ont démontré que de nombreux neurotransmetteurs étaient impliqués dans les réactions nociceptives et que les récepteurs NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid) étaient les plus importants dans la transmission de la douleur chronique et aiguë (Dickenson 1995).

Le récepteur NMDA est bloqué au repos par un ion magnésium qui n'est retiré du canal que lorsque la membrane du neurone est suffisamment dépolarisée et que deux molécules de glutamate et deux molécules de glycine, son co-agoniste, le stimulent (Bleakman et al. 2006). Ainsi, les récepteurs NMDA sont les récepteurs majoritaires dans la

neurotransmission rapide excitatrice dans le SNC. Ils jouent un rôle important dans la sensibilisation centrale, notamment dans le cas de la douleur de longue durée (Coderre 1993) ou intense ou prolongée (Bleakman et al. 2006). Une fois stimulé, le récepteur NMDA va permettre l'entrée de Ca^{2+} au niveau post-synaptique qui va permettre la propagation du signal nociceptif mais aussi l'activation de protéines kinases (Figure 20).

Les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate)/Kainates semblent médier la transmission de l'excitation à la synapse entre les fibres afférentes primaires et les neurones de la corne dorsale en réponse à une stimulation douloureuse (Yoshimura et al. 1990).

L'inactivation du glutamate se fait par la capture de celui-ci dans la fente synaptique via des transporteurs actifs situés sur les membranes de la terminaison de la fibre afférente primaire et des astrocytes qui l'entourent.

Le rôle de neuromédiateurs comme la substance P au niveau des terminaisons centrales des fibres afférentes primaires est plutôt controversé et agirait plutôt dans l'inflammation neurogénique en périphérie. Or, la PIV est un mécanisme indépendant de la SP (Fromy et al. 2000). Pour ces deux raisons, son rôle au niveau spinal est peu probable et n'a pas été étudié.

En revanche, le rôle de neuromédiateur du CGRP est suggéré. L'activation des fibres afférentes primaires en périphérie est capable d'induire le relargage du CGRP au niveau de la fente synaptique. Bien qu'indiscutables, les responsabilités relatives du CGRP dans la transmission des messages nociceptifs au niveau de la moelle ne sont pas clairement établies aujourd'hui. Le CGRP jouerait plutôt un rôle de sensibilisateur (Sun et al. 2004a). Certaines études ont démontré que le CGRP présent dans les noyaux centraux des amygdales aggrave les réponses comportementales nociceptives et affectives chez les animaux sains en facilitant la transmission synaptique via la PKA, les récepteurs NMDA ainsi que l'excitabilité neuronale. Ainsi, les niveaux accrus de CGRP dans les noyaux centraux des amygdales pourraient déclencher la douleur en l'absence de dommages tissulaires (Han et al. 2010).

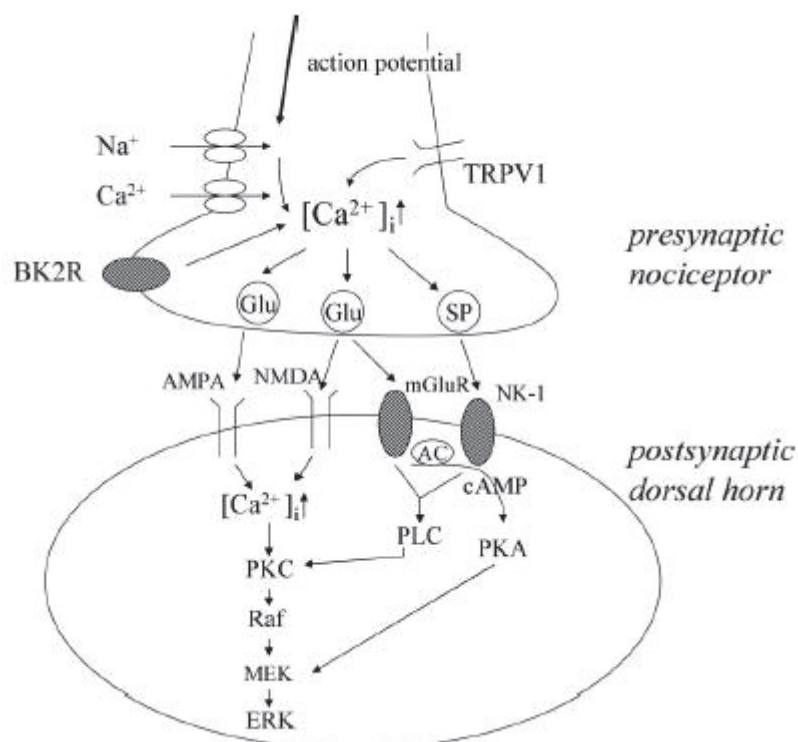


Figure 20. Schéma démontrant les mécanismes spinaux au niveau des fibres afférentes primaires centrales après l'activation par la capsaïcine (Yanagitate et al. 2006).

Le but de cette étude était de démontrer que la PIV a besoin d'une voie sensorielle spinale pour se développer et que lorsque cette voie sensorielle spinale est altérée, le risque d'escarres est augmenté à distance du blocage (cuisses). Cette observation permettrait d'établir un lien direct entre la perte de la PIV et l'augmentation du risque d'escarres.

Pour confirmer la nécessité d'une transduction sensorielle spinale, nous avons réalisé dans un premier temps une rachianesthésie (bloc moteur et sensoriel) et étudié la PIV à distance du blocage pharmacologique (sur les cuisses).

Pour clarifier le mécanisme de la PIV au niveau spinal, nous avons ensuite injecté des bloqueurs spécifiques en intrathécal afin d'étudier le rôle des récepteurs spinaux sensoriels présents sur les fibres afférentes primaires (TRPV1, CGRP), ainsi que le rôle des récepteurs au glutamate (principal neurotransmetteur exciteur au niveau spinal) (NMDA et non-NMDA) d'une part sur la fonction neurovasculaire (PIV) et vasculaire (ACh, SNP) cutanée et d'autre part sur les seuils nociceptifs mécanique et thermique grâce à des tests comportementaux.

La PIV étant suggérée comme un mécanisme protecteur de la peau vis-à-vis des escarres, nous avons également étudié les conséquences d'une compression prolongée sur une peau privée de PIV suite à des blocages pharmacologiques au niveau spinal afin d'évaluer l'influence de la transduction sensorielle spinale sur l'incidence d'escarres.

Les résultats relatifs à cette partie de ma thèse sont présentés sous la forme d'un article complet (en préparation).

*Article : **Manuscrit en préparation.***

“La PIV : reflet de l'état de la microcirculation cutanée et des risques d'escarres”

Stéphanie Gohin, Dominique Sigaud-Roussel, Gérard Morel, Jean Louis Saumet, Bérengère Fromy.

Matériels et méthodes

Modèle animaux

Les expériences ont été réalisées chez des rats Wistar mâles pesant entre 200 et 400g (7 à 10 semaines). Ces animaux ont été maintenus dans un cycle jour/nuit de 12H/12H, avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Toutes les procédures réglementaires comportant l'utilisation des animaux ont été scrupuleusement respectées et le protocole a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animal Rhône Alpes n° d'enregistrement : 0224. Deux jours avant les manipulations, les poils des rats ont été retirés à l'aide d'une lotion dépilatoire au niveau du dos et des cuisses permettant la mesure du flux sanguin cutané et l'application des sondes. Ensuite, les animaux ont été anesthésiés avec du Nesdonal (50mg/kg, i.p.). Les rats ont alors été placés sur le ventre dans une couveuse (MP4SI, de Mediprema, Chambray, France) chauffée pour maintenir une température cutanée stable pendant toute l'expérience ($35.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$). La température cutanée a été mesurée à l'aide d'un thermocouple (Physitemp BAT-12, Physitemp instruments INC, Clifton, USA). La pression artérielle systolique (ABP) a été mesurée au début et à la fin de l'expérience grâce à un capteur de pression placé sur la queue (XBP-1000, Kent scientifique, Torrington, Etats-Unis).

Evaluation de la PIV

Comme précédemment décrit, la variation du flux sanguin cutané en réponse à l'application d'une pression locale non nociceptive progressivement croissante a été évaluée au niveau de la cuisse des rats à l'aide d'un laser Doppler (PF801, Periflux Perimed, Suède). La pression est appliquée sur la peau au niveau de la cuisse de l'animal, et augmentée progressivement de 11,1 Pa/s pendant 20 minutes. Un enregistrement des valeurs de repos est effectué pendant une minute avant le début de l'application de la pression.

Evaluation des réponses dépendante et indépendante de l'endothélium

Comme décrit dans le chapitre 2, la variation du flux sanguin cutané a été enregistrée à l'aide d'une sonde iontophorèse couplée à un laser Doppler (PF5000, Perimed, Suède) placée sur les cuisses des rats après l'administration iontophorétique anodale d'ACh 2 % (20s ; 0.1mA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) et après administration iontophorétique cathodale de SNP 2 % (20s ; 0.1mA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne). Les réponses ont été mesurées pendant 15 minutes et une minute de base a été nécessaire avant l'administration iontophorétique d'ACh et de SNP.

Réalisation des injections intrathécales chez le rat

Les injections intrathécales ont été réalisées sous anesthésie générale (Isoflurane) pour les tests comportementaux.

Le rat a été positionné afin que son dos soit rond permettant l'écartement des vertèbres. Puis une aiguille de 25 Ga a été insérée au niveau des lombaires L5 et L6 bien perpendiculaire à l'animal pour les drogues (Mestre et al. 1994) (Figure 21). Après un repérage visuel du point d'injection, l'aiguille progresse jusqu'à rencontrer une résistance de la dure mère au niveau de l'espace sous arachnoïdien accompagné d'un mouvement de la queue de l'animal confirmant la bonne position. Les injections au niveau des lombaires L5 et L6 va induire le blocage de nerfs cutanés postérieurs qui innervent les cuisses des rats via les fibres C (Puigdellivol-Sanchez et al. 2000; Shehab et al. 2004).

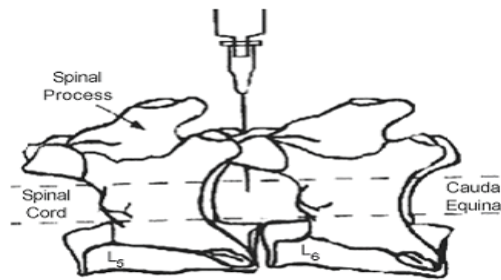


Figure 21. Représentation de l'injection dans l'espace intervertébral des lombaires L5 et L6. D'après Mestre *et al*, 1994.

Tests comportementaux

Les tests comportementaux Tail Flick, Randall Selitto et Von frey précédemment décrits ont été réalisés chez des rats vigiles avant et après injection intrathécale des différentes drogues et les mesures ont été prises à 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 90, 120, 150, 180, 210, 240 minutes après les injections.

Etude de l'incidence d'escarres après une ischémie prolongée de la peau

Deux jours après cette chirurgie décrite page 32, le protocole d'ischémie prolongé de la peau pendant 6h est réalisé à l'aide d'un aimant de 15mm dans trois groupes d'animaux différents recevant une injection intrathécale des différentes drogues (Peirce et al. 2000).

Mesures enregistrées par le laser Doppler imageur de perfusion sanguine

Un dégradé de couleur du bleu (peu perfusé) au rouge (très perfusé) du territoire cutané est visualisé grâce au laser Doppler imageur (LDPI) (Speckle, PERIMED, Suède). Après analyse par ordinateur (LDPI win 3, PERIMED, Suède), une cartographie du flux sanguin cutané présent au niveau de l'application de l'aimant nous est par la suite représentée et la visualisation de zone ischémisée est possible.

Examen histologique de la peau

Les échantillons de peau intéressants ont été directement récupérés sous les zones de compression. Tous les échantillons ont été fixés dans du formol et fixés en paraffine. Des sections de 5µm ont ensuite été colorées avec la coloration hématoxyline-éosine-safran pour explorer les différentes structures de la peau.

Protocoles

Protocole 1: Rôle de la transduction sensorielle spinale

Les tests comportementaux ont été réalisés sur les rats vigiles pendant 240 minutes après avoir reçu une injection intrathécale de saline ($n=10$), de bupivacaïne (anesthésique locale) (1%, $n=10$) et de capsazépine (antagoniste des TRPV1) (20 µg, $n=10$) (Horvath et al. 2008; Sakura et al. 2005).

Après une injection intrathécale de saline ($n=10$), de bupivacaïne (anesthésique locale) (1%, $n=10$) et de capsazépine (antagoniste des TRPV1) (20 µg, $n=10$), les tests neurovasculaires (PIV) et vasculaires (ACh ou SNP) ont été réalisés sur les rats anesthésiés.

Protocole 2: Etude mécanistique de certains candidats présents sur les fibres sensorielles spinales

Les tests comportementaux ont été réalisés sur les rats vigiles pendant 240 minutes après avoir reçu une injection intrathécale de saline ($n=10$), de CGRP 8-37 (antagoniste des récepteurs du CGRP) (10nmol, $n=10$), de MK-801 (antagoniste des NMDA) (40nmol, $n=10$) et de NBQX (antagoniste des non-NMDA) (20nmol, $n=10$) (Kong et al. 2006; You et al. 2005; Yu et al. 1996).

Après une injection intrathécale de saline ($n=10$), de CGRP 8-37 (antagoniste des récepteurs du CGRP) (10nmol, $n=10$), de MK-801 (antagoniste des NMDA) ($n=10$) et de NBQX (antagoniste des non-NMDA) ($n=10$), les tests neurovasculaires (PIV) et vasculaires (ACh ou SNP) ont été réalisés sur les rats anesthésiés.

Protocole 3: Participation des fibres motrices et sensorielles spinales dans l'incidence d'escarres

Après une injection intrathécale de saline, de bupivacaïne (anesthésique locale) ($n=10$) et de capsazépine (antagoniste des TRPV1) ($n=10$), une ischémie prolongée a été réalisée par compression de la peau à l'aide de l'application d'un aimant de 11kPa sur des rats vigiles.

Après la compression de la peau pendant 6h, le flux sanguin cutané a été visualisé grâce au laser imageur Speckle juste après le retrait de l'aimant, à 5min, 10min, 15min, 30min, 60min, 120min et 24h.

Des biopsies de peau au niveau de la compression ont été réalisées 24h après le retrait de l'aimant, afin de réaliser des coupes histologiques.

Drogues

La bupivacaïne, la capsazépine, le dizocilpine maleate (MK-801) et le 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le CGRP8-37 a été acheté chez Polypeptide groupe (Strasbourg, France).

Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés avec la moyenne \pm SEM (erreur standard moyenne).

Dans l'exploration de la microcirculation cutanée chez le rat anesthésié, les valeurs moyennes du flux sanguin cutané correspondant au niveau de base ont été calculées sur 1 min d'enregistrement avant l'application du stimulus (pression ou stimulation iontophorétique d'ACh et de SNP). Pour le reste de la manipulation, le flux sanguin a été moyenné toutes les 10 s dans le but de réduire la variabilité du signal liée à la vasomotion cutanée. Les vasodilatations ont été exprimées en pourcentage du flux sanguin cutané par rapport à la valeur de base.

Afin de déterminer la différence entre deux points de mesure au sein d'un groupe, nous avons effectué un test de Student apparié. Par contre, pour déterminer la significativité des résultats entre deux groupes, nous avons utilisé un test de Student non apparié, alors que nous avons utilisé une analyse de variance (test ANOVA) suivi d'un post-test Newman Keuls pour comparer plusieurs groupes.

Les valeurs des tests comportementaux mécaniques (Von Frey, Randall Selitto) ont été moyennées sur les deux pattes arrières droite et gauche. Au sein de chaque groupe, l'effet de la substance injectée a été évalué en comparant chaque mesure post-injection avec la mesure effectuée avant l'injection à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un post-test Dunnett.

$P < 0.05$ est considéré comme une différence significative.

Résultats

Les groupes témoins recevant des injections intrathécales de saline ont été réalisés à tous les temps 10 min, 20min et 30min correspondant au temps d'action maximum des drogues utilisées dans l'étude. Mais par souci de clarté, toutes les données ont été regroupées car il n'existait pas de différence significative entre les groupes témoins.

De plus, les différentes injections intrathécales n'ont induit aucune différence significative concernant la pression artérielle systolique et le niveau de base du flux sanguin cutané.

Protocole 1: Rôle de la transduction sensorielle spinale

Tests comportementaux : recherche du temps d'action optimal des drogues

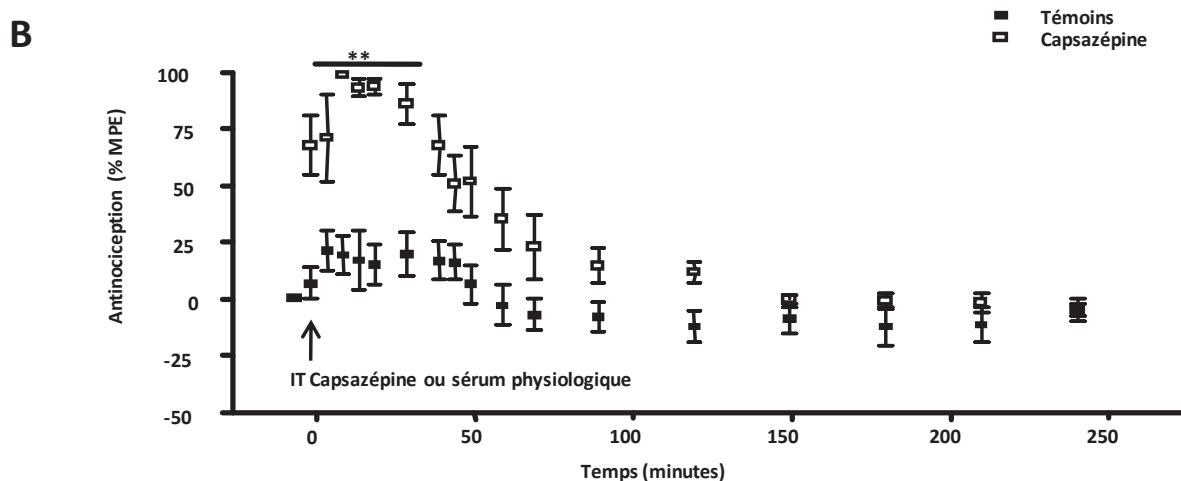
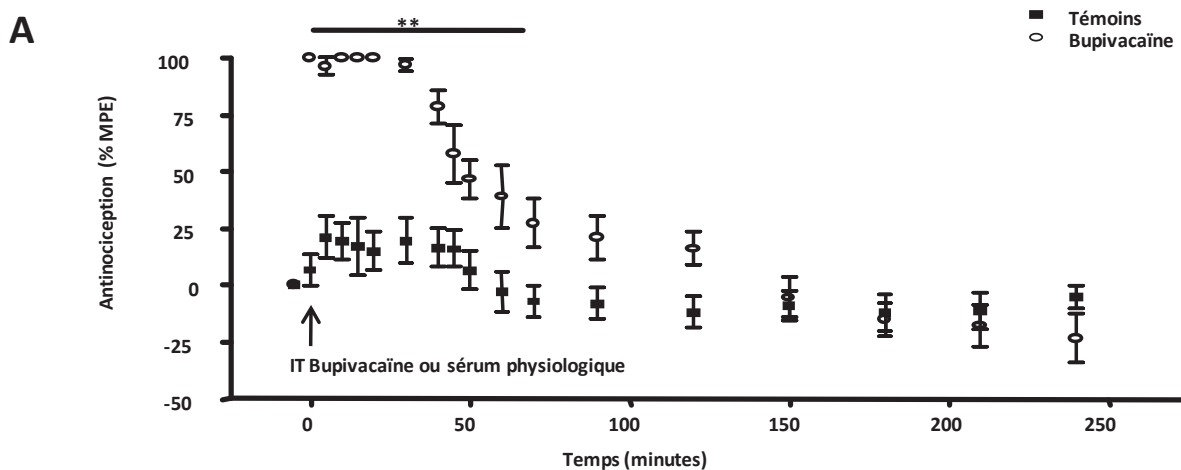


Figure 22. Temps de latence en réponse à une stimulation thermique nociceptive sur la queue (« tail flick ») au cours du temps après blocage spinal par bupivacaïne (A) et par capsazépine (B) chez des rats sains. Les temps de latence ont été estimés par rapport à l'effet maximum possible (%MPE = (temps maximal après traitement – base) / (seuil maximum de mesure – base) x 100)). **P < 0.01 vs témoins. Two-Way ANOVA, post test Bonferroni.

L'injection intrathécale de bupivacaïne a augmenté le %MPE de 0 à 70 minutes par rapport aux rats témoins (injection intrathécale de sérum physiologique) avec un maximum à 30 minutes (Figure 22A). Pour cette raison, les autres paramètres (PIV, ACh, SNP, pose aimant) ont été mesurés 30 min après l'injection de bupivacaïne.

L'injection intrathécale de capsazépine a augmenté le %MPE de 0 à 30 minutes par rapport aux rats témoins (injection intrathécale de sérum physiologique) avec un maximum à 20 minutes (Figure 22B). Pour cette raison, les autres paramètres (PIV, ACh, SNP, pose aimant) ont été mesurés 20 min après l'injection de capsazépine.

Les résultats démontrés avec le Randall Selitto et avec le Von Frey confirment les résultats du tail flick (datas non montrées).

Après l'injection intrathécale de bupivacaïne, en plus des modifications des tests comportementaux, nous avons observé une paralysie de l'arrière train des rats confirmant un blocage moteur. A l'inverse, après l'injection intrathécale de capsazépine, les rats pouvaient se déplacer normalement sur leurs quatre pattes, confirmant un blocage sensitif uniquement. En plus du blocage sensitif des fibres C, un blocage moteur a été observé après une injection intrathécale de bupivacaïne contrairement à l'injection intrathécale de capsazépine.

Tests microcirculatoires :

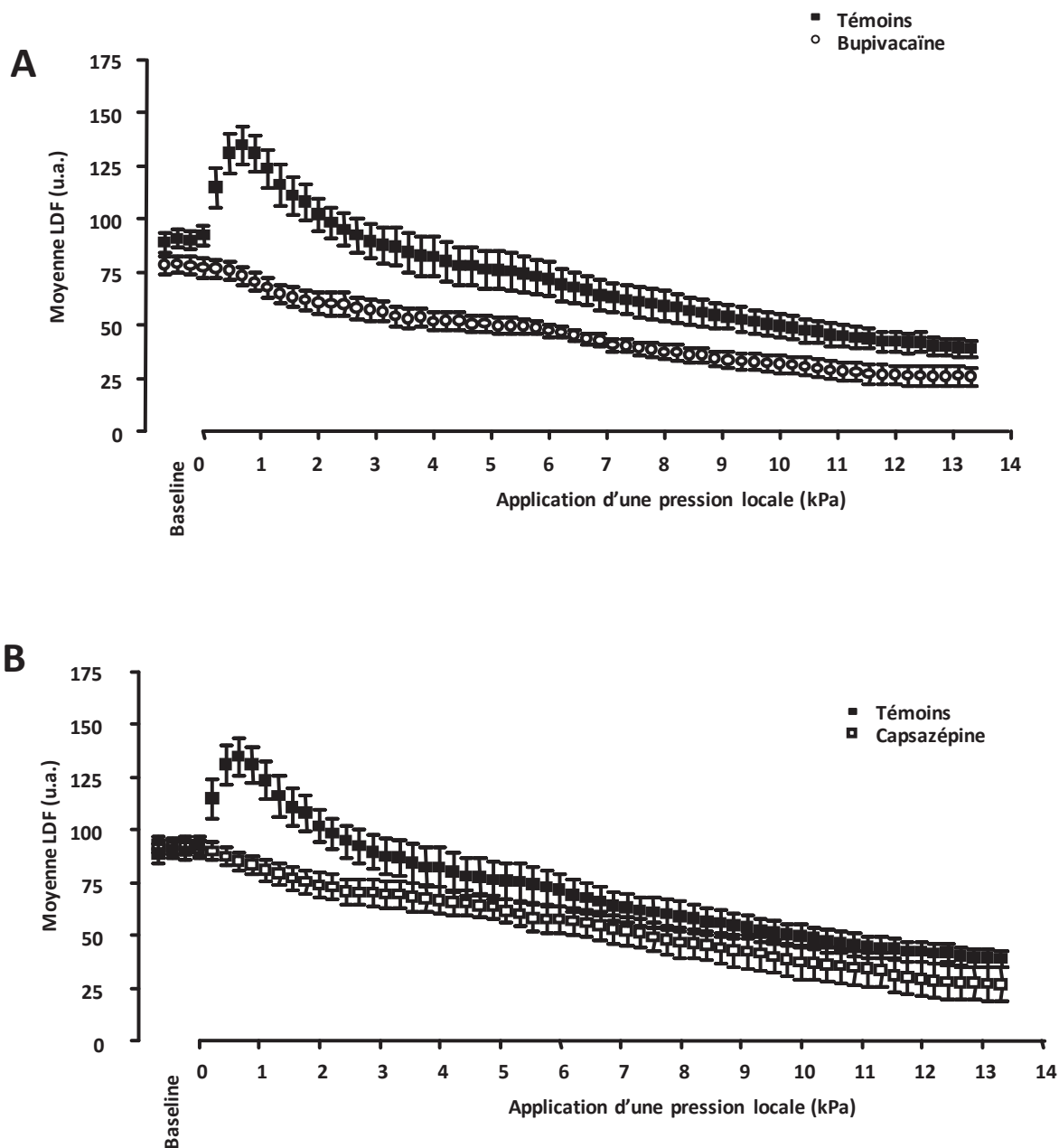


Figure 23. (A) Cinétique dans le temps du flux sanguin cutané en réponse à l'application d'une pression de 11.1Pa/s chez des rats témoins recevant une injection intrathécale de sérum physiologique ($n=10$) et chez des rats recevant une injection intrathécale de bupivacaïne (1%, $n=10$).

(B) Cinétique dans la temps représentant le flux sanguin cutané en réponse à l'application d'une pression de 11.1Pa/s chez des rats témoins recevant une injection intrathécale de sérum

physiologique ($n=10$) et chez des rats recevant une injection intrathécale de capsazépine (20 μg , $n=10$).

En réponse à l'application locale d'une pression chez les rats témoins (saline, i.t.), le flux sanguin cutané a augmenté de 90 ± 4 u.a au repos à une valeur maximale de 135 ± 9 u.a ($P<0.001$) pour une pression locale de 0.56 kPa, représentant une PIV de 51 ± 7 %. Lorsque la pression devient plus importante, le flux sanguin commence à diminuer et devient significatif par rapport au repos à 7kPa correspondant à une diminution de $-29\pm 7\%$ (Figures 23A et B).

Chez les rats recevant une injection intrathécale de bupivacaïne, l'application locale d'une pression n'induit pas d'augmentation de flux sanguin cutané mais à l'inverse induit progressivement une diminution du flux sanguin cutané passant de 79 ± 4 u.a au repos à 74 ± 4 u.a pour une pression de 0.56 kPa (pression correspondante à la PIV maximale chez les rats témoins) représentant une diminution non significative de -6 ± 1 % ($P<0.01$) (figure 23A). La baisse du flux sanguin cutané sous l'effet de la pression devient significative à 3kPa, correspondant à une diminution de $-25\pm 5\%$ (Figure 23A).

Comme pour la bupivacaïne, chez les rats recevant une injection intrathécale de capsazépine, l'application locale d'une pression induit progressivement une diminution du flux sanguin cutané passant de 92 ± 4 u.a au repos à 86 ± 4 u.a pour une pression de 0.56 kPa, représentant une diminution non significative de -6 ± 2 % ($P<0.01$) (figure 23B). La baisse du flux sanguin cutané sous l'effet de la pression devient significative à 3kPa, correspondant à une diminution de $-24\pm 7\%$ (Figure 23B).

Les injections i.t. de bupivacaïne et de capsazépine injectée en intrathécale ont donc totalement aboli la PIV (respectivement 51 ± 7 % vs -6 ± 1 %, $P<0.001$; 51 ± 7 % vs -6 ± 2 %, $P<0.001$). Parallèlement, l'écrasement cutané (baisse significative du flux sanguin cutané par rapport à la valeur de repos) arrive plus précocement après les injections intrathécales de bupivacaïne et de capsazépine (3kPa) par rapport à la saline (7kPa).

En revanche, les réponses endothélium dépendante (ACh) et indépendante (SNP) n'ont pas été modifiées par les injections intrathécales de bupivacaïne et de capsazépine (Tableau 1).

	IT Saline	IT Bupivacaine	IT Capsazepine	P<0.05
% Ach par rapport au niveau de base	60 ± 5	69 ± 10	62 ± 9	ns
% SNP par rapport au niveau de base	92 ± 12	103 ± 21	95 ± 22	ns

Tableau 1. Pourcentages d’augmentation du flux sanguin cutané par rapport à la valeur de base en réponse à l’ACh et en réponse au SNP chez des rats témoins recevant une injection intrathécale de sérum physiologique ($n=10$) et chez des rats traités recevant une injection intrathécale de bupivacaine (1%, $n=10$) et recevant une injection intrathécale de capsazépine (20 μg , $n=10$) (One-Way ANOVA, post test Dunett).

Protocole 2: Etude mécanistique de certains candidats présents sur les fibres sensorielles spinales

Tests comportementaux : recherche du temps d’action optimal des drogues

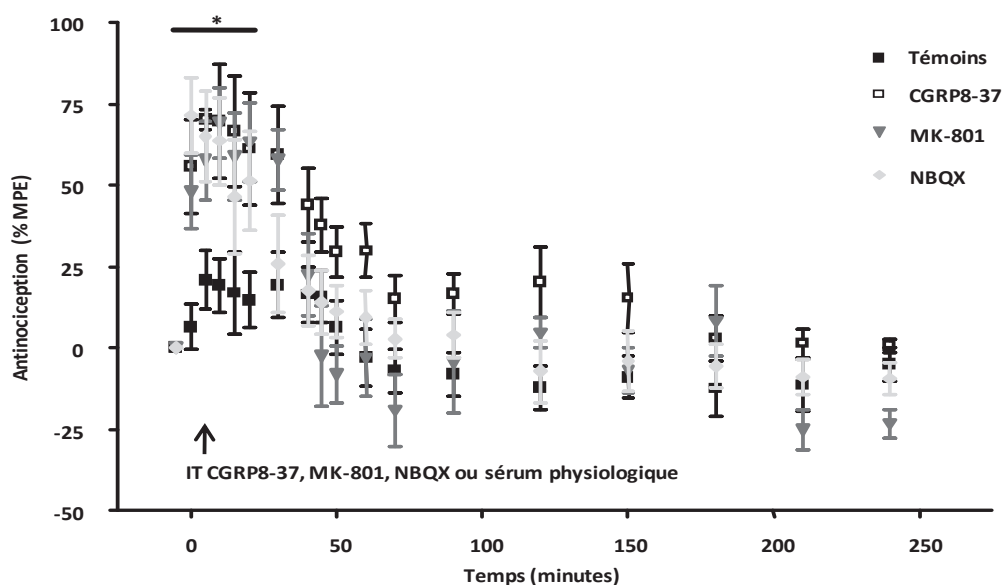


Figure 24. Temps de latence en réponse à une stimulation thermique nociceptive sur la queue (« tail flick ») au cours du temps après blocage spinal par le CGRP8-37, par le MK-801 et par le NBQX chez des rats sains. Les temps de latence ont été estimés par rapport à l'effet maximum possible (%MPE = (temps maximal après traitement – base) / (seuil maximum de mesure – base) x 100)). *P < 0.05 vs témoins. Two-Way ANOVA, post test Bonferroni.

L'injection intrathécale de CGRP8-37, de MK-801 et de NBQX a augmenté le %MPE de 0 à 20 minutes par rapport aux rats témoins (injection intrathécale de sérum physiologique) avec un maximum à 10 minutes (Figure 24).

Les résultats démontrés avec le Randall Selitto et avec le Von Frey confirment les résultats du tail flick (datas non montrées). Pour cette raison, les autres paramètres (PIV, ACh, SNP, pose aimant) ont été mesurés 10 min après l'injection de CGRP8-37, de MK-801 et de NBQX.

En plus du blocage sensitif des fibres C, un comportement d'agitation a été observé après une injection intrathécale de MK-801 et de NBQX (Lutfy et al. 1997) contrairement à l'injection intrathécale de CGRP8-37. Aucun blocage moteur n'a été observé avec les injections intrathécales de CGRP8-37, MK-801 et NBQX.

Tests microcirculatoires :

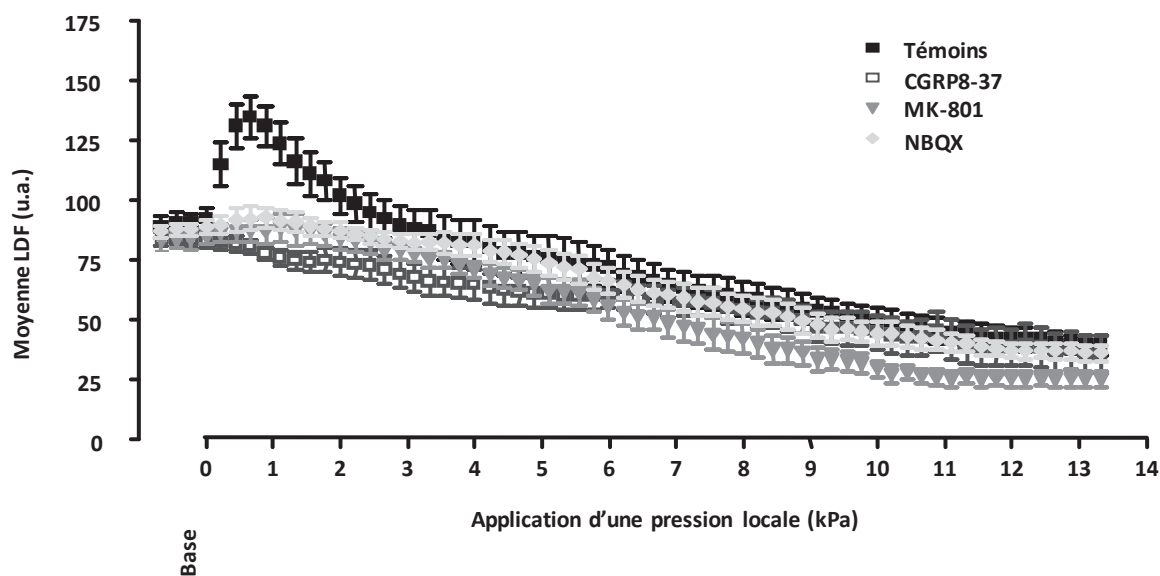


Figure 25. Cinétique dans le temps du flux sanguin cutané en réponse à l'application d'une pression de 11.1Pa/s chez des rats témoins recevant une injection intrathécale de sérum physiologique ($n=10$) et chez des rats traités recevant une injection intrathécale de CGRP8-37 (10 nmol, $n=10$), recevant une injection intrathécale de MK-801 (40 nmol, $n=10$), et recevant une injection intrathécale de NBQX (20 nmol, $n=10$).

En réponse à l'application locale d'une pression chez les rats témoins (saline, i.t.), le flux sanguin cutané a augmenté de 90 ± 4 u.a au repos à une valeur maximale de 135 ± 9 u.a ($P < 0.001$) pour une pression locale de 0.56 kPa, représentant une PIV de 51 ± 7 %. Lorsque la

pression devient plus importante, le flux sanguin commence à diminuer et devient significatif par rapport au repos à 7kPa correspondant à une diminution de $-29\pm 7\%$ (Figure 25).

En réponse à l'application locale d'une pression chez les rats recevant une injection intrathécale de CGRP8-37, le flux sanguin cutané n'a pas augmenté passant de 84 ± 3 u.a au repos à 81 ± 3 u.a ($P>0.05$) pour une pression locale de 0.56 kPa, représentant une abolition de $-3\pm 2\%$ (figure 23). La baisse du flux sanguin cutané sous l'effet de la pression devient significative à 4 kPa, correspondant à une diminution de $-26\pm 7\%$ (Figure 25).

En réponse à l'application locale d'une pression chez les rats recevant une injection intrathécale de MK-801, le flux sanguin cutané n'a pas augmenté passant de 83 ± 4 u.a au repos à 87 ± 5 u.a ($P>0.05$) pour une pression locale de 0.56 kPa, représentant une abolition de $4\pm 3\%$ (figure 23). La baisse du flux sanguin cutané sous l'effet de la pression devient significative à 4 kPa, correspondant à une diminution de $-17\pm 7\%$ (Figure 25).

En réponse à l'application locale d'une pression chez les rats recevant une injection intrathécale de NBQX, le flux sanguin cutané n'a pas augmenté passant de 88 ± 2 u.a au repos à 92 ± 5 u.a. ($P>0.05$) pour une pression locale de 0.56 kPa, représentant une diminution non significative de $5\pm 4\%$ (figure 23). La baisse du flux sanguin cutané sous l'effet de la pression devient significative à 6 kPa, correspondant à une diminution de $-21\pm 7\%$ (Figure 25).

Le CGRP8-37, le MK-801 et le NBQX injectés en intrathécale ont donc aboli la PIV (respectivement $51\pm 7\%$ vs $-3\pm 2\%$, $P<0.001$; $51\pm 7\%$ vs $4\pm 3\%$, $P<0.001$; $51\pm 7\%$ vs $5\pm 4\%$, $P<0.001$) (One-Way ANOVA, post test Dunett).

A l'inverse, les réponses endothélium dépendante (ACh) et indépendante (SNP) n'ont pas été modifiées par les injections intrathécales de CGRP8-37, de MK-801 et de NBQX (Tableau 2).

	IT Saline	IT CGRP8-37	IT MK-801	IT NBQX	P<0.05
% ACh par rapport au niveau de base	60 ± 5	49 ± 6	64 ± 12	67 ± 10	ns
% SNP par rapport au niveau de base	92 ± 12	71 ± 12	97 ± 21	65 ± 12	ns

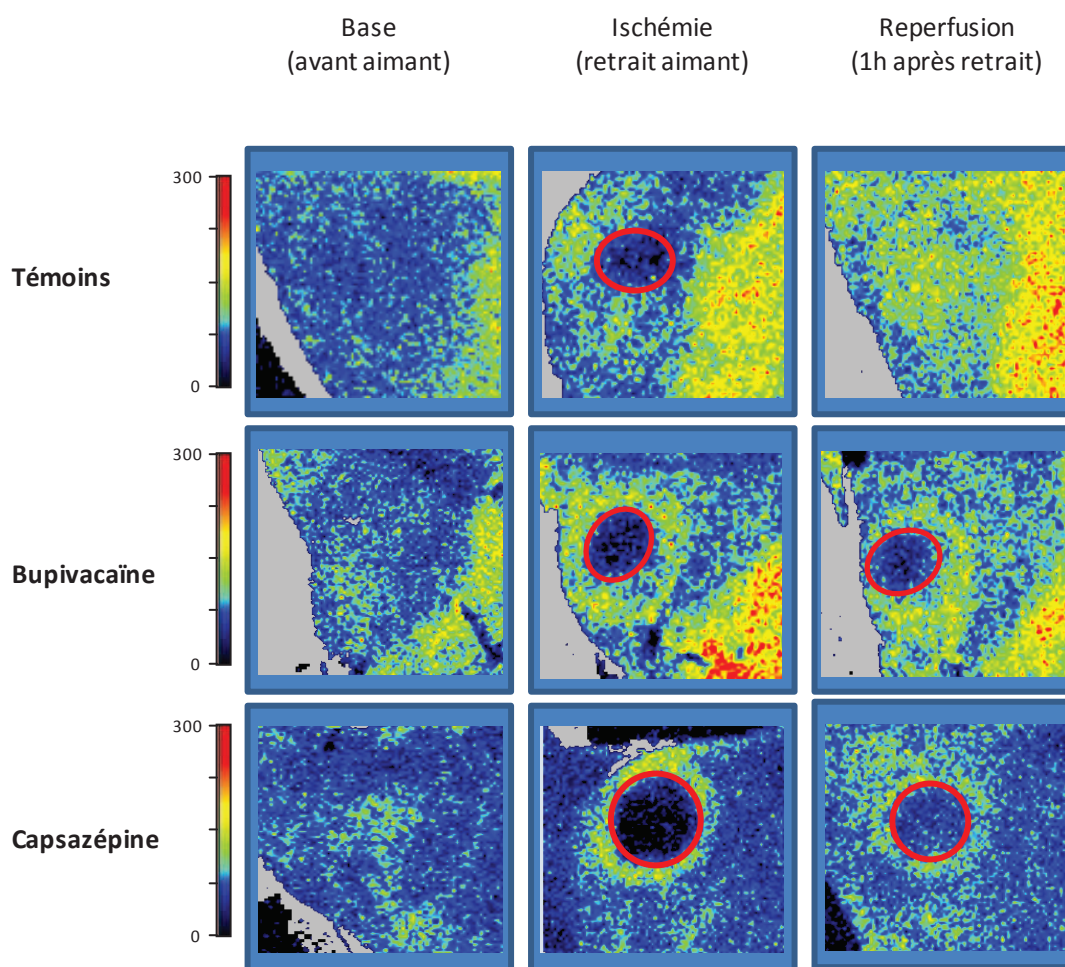
Tableau 2. Pourcentages d'augmentation du flux sanguin cutané par rapport à la valeur de base en réponse à l'ACh et en réponse au SNP chez des rats témoins recevant une injection intrathécale

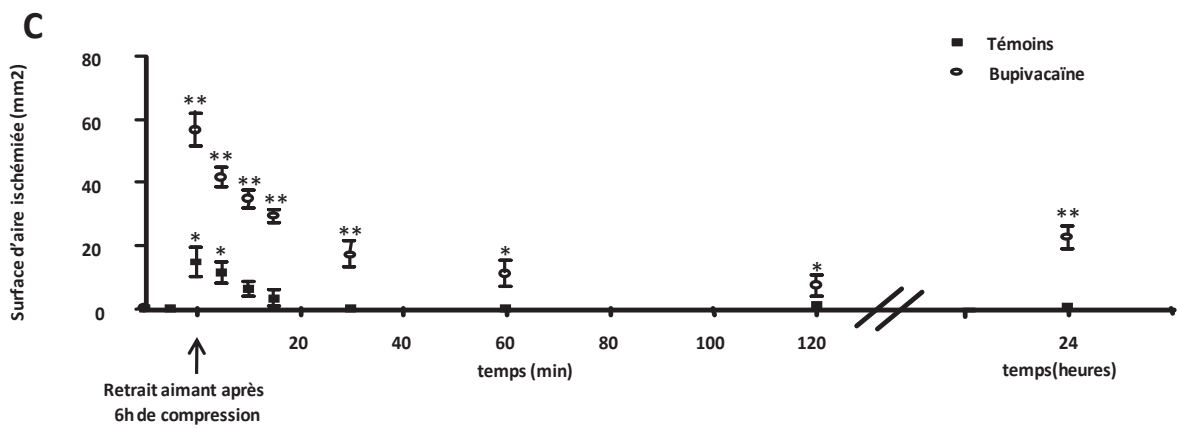
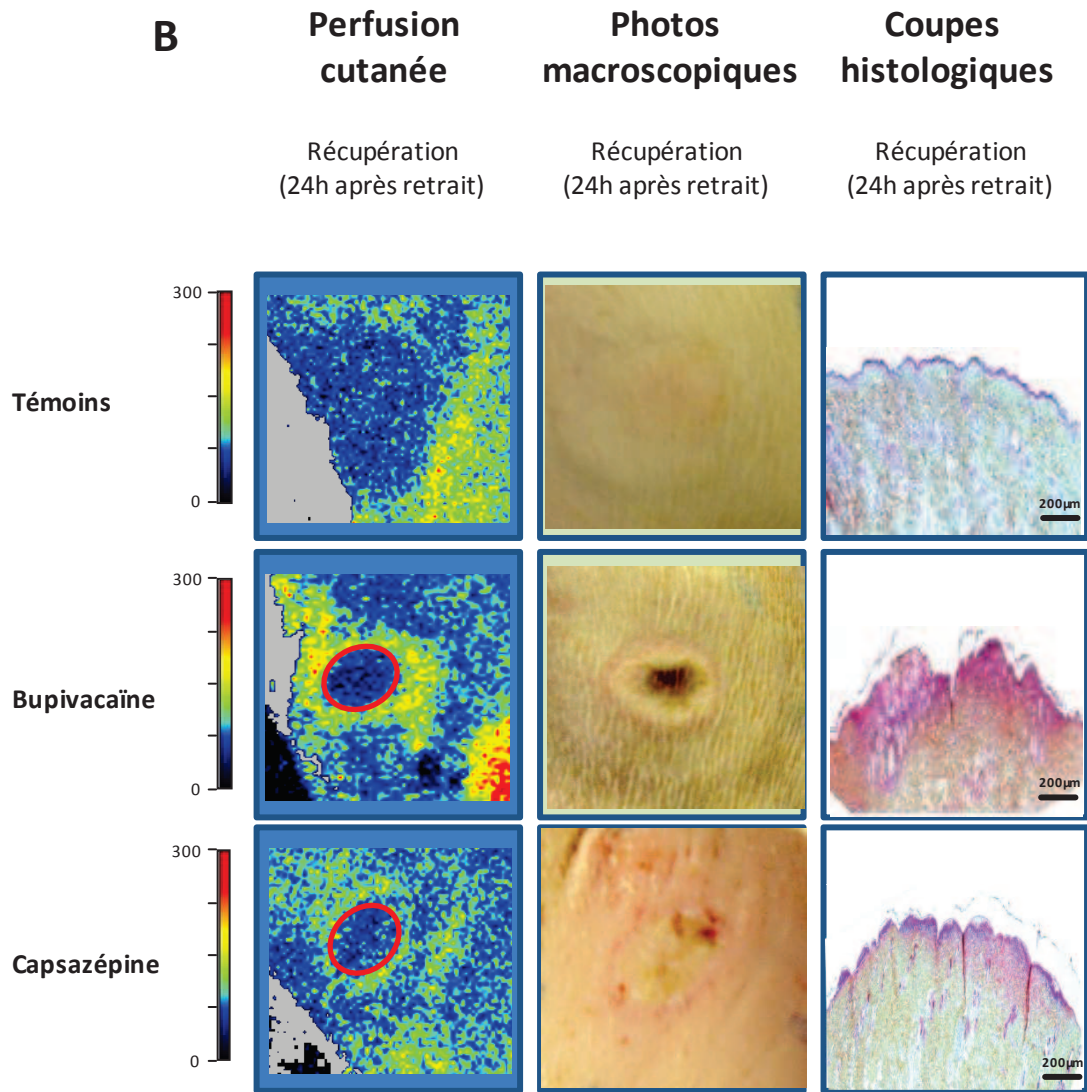
de sérum physiologique ($n=10$) et chez des rats traités recevant une injection intrathécale de CGRP8-37 (10 nmol, $n=10$), recevant une injection intrathécale de MK-801 (40 nmol, $n=10$), et recevant une injection intrathécale de NBQX (20 nmol, $n=10$) (One-Way ANOVA, post test Dunett).

Protocole 3: Participation des fibres motrices et sensorielles spinales dans l'incidence d'escarres

A

Perfusion cutanée





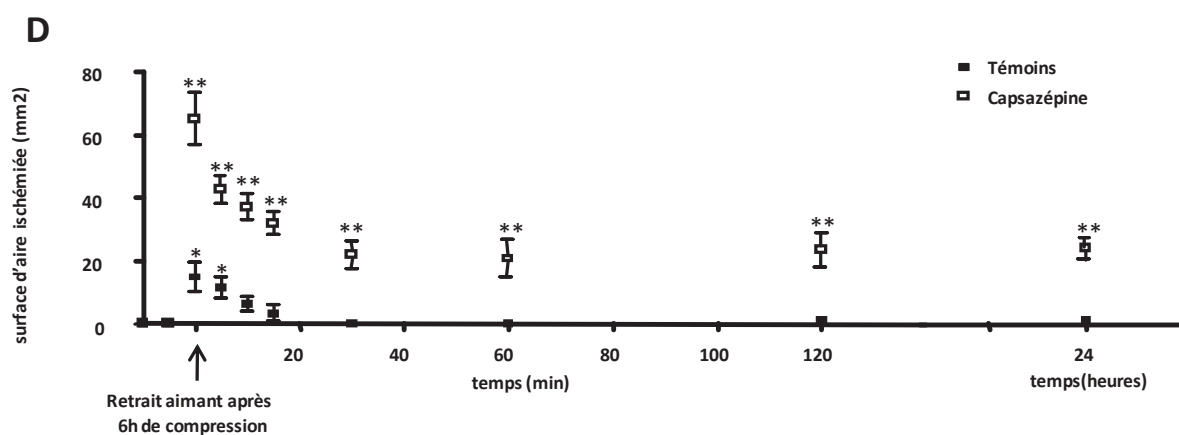


Figure 26. Incidence d'escarres après un blocage moteur et/ou sensoriel.

(A) Cartographie du flux sanguin cutané par LDI à différents temps : base (avant la compression), ischémie (immédiatement après la levée de la compression), reperfusion (1h après le retrait de l'aimant). Les cercles rouges correspondent aux surfaces d'ischémies.

(B) LDI (24h après le retrait de l'aimant), photos macroscopiques et coupes histologiques de rats témoins (sérum physiologique, $n=10$) et de rats traités à la bupivacaïne (1%, i.t., $n=10$) et à la capsazépine (10 μ g, i.t., $n=10$). Les cercles rouges correspondent aux surfaces d'ischémies.

(C) Surface de zones ischémisées en fonction du temps chez des rats témoins (sérum physiologique, $n=10$) et de rats traités à la bupivacaïne (1%, i.t., $n=10$). * $P < 0.05$ vs valeurs de base au sein du même groupe. ** $P < 0.01$ vs valeurs de base au sein du même groupe. One-Way ANOVA, post test Dunnett.

(D) Surface de zones ischémisées en fonction du temps chez des rats témoins (sérum physiologique, $n=10$) et de rats traités à la capsazépine (20 μ g, i.t., $n=10$). * $P < 0.05$ vs valeurs de base au sein du même groupe. ** $P < 0.01$ vs valeurs de base au sein du même groupe. One-Way ANOVA, post test Dunnett.

Immédiatement après la levée de la compression (retrait aimant), les images de perfusion nous permettent de visualiser une zone ischémisée (LDI<50 u.a.). Cette zone ischémisée est présente dans tous les groupes même si elle est augmentée après les injections de bupivacaïne (57 \pm 5 u.a.) (blocage moteur et sensitif spinal) et de capsazépine (65 \pm 8u.a.) (blocage sensitif spinal) par rapport au sérum physiologique (15 \pm 5u.a.)(Figures 26A, C et D).

Cette zone disparaît totalement à partir d'une heure après le retrait de l'aimant chez les animaux témoins alors qu'elle persiste jusqu'à 24h chez les animaux traités à la bupivacaïne et à la capsazépine (Figures 26A, C et D).

Les photos macroscopiques démontrent la présence de lésions ischémiques faisant suite à une compression de 6h chez les animaux recevant une injection intrathécale de bupivacaïne et de capsazépine contrairement aux rats témoins recevant une injection intrathécale de saline (Figure 26B).

Ceci est corrélé avec les coupes histologiques qui montrent une désorganisation de l'épiderme et du derme ainsi qu'avec une hémorragie et une inflammation caractérisée par une quantité importante de leucocytes chez les animaux traités à la bupivacaïne et à la capsazépine (Figure 26B).

De plus, la présence d'escarres chez les rats témoins (sérum physiologique, i.t.) est de 2 rats sur 10 correspondant à une incidence de 20% ; celle suite à une injection intrathécale de bupivacaïne est de 8 rats sur 11 correspondant à une incidence de 73 % et enfin celle suite à une injection intrathécale de capsazépine est de 7 rats sur 10 correspondant à une incidence de 70 %.

Discussion

Les injections intrathécales de bupivacaïne (blocage moteur et sensoriel) et de capsazépine (blocage sensoriel) ont aboli la PIV au niveau des cuisses sans altérer les fonctions vasculaires cutanées dépendantes ou non de l'endothélium. Dans ces conditions, une compression prolongée (6h) sur une peau privée de PIV conduit à une incidence plus élevée d'escarres (70%) avec une désorganisation du derme et de l'épiderme probablement liée à l'absence de reperfusion conduisant à une ischémie cutanée présente jusqu'à 24 heures. A l'inverse, lorsque la peau saine bénéficie de la présence d'une PIV, une compression prolongée provoque une incidence limitée d'escarres (20%) avec une ischémie qui disparaît totalement dès 1h après la levée de la compression.

Sur le plan mécanistique, les injections intrathécales de CGRP8-37, MK-801 et NBQX ont également conduit à l'abolition totale de PIV sans altérer les fonctions vasculaires cutanées, montrant que les récepteurs CGRP, NMDA et non-NMDA spinaux sont impliqués dans la PIV.

La PIV est abolie par l'injection intrathécale de bupivacaïne (anesthésique locale), responsable d'un blocage moteur et sensoriel (Kanai et al. 1999). En effet, au niveau spinal, la bupivacaïne induit un blocage non spécifique des canaux sodiques voltages dépendants (Liu et al. 2000). Or, les courants sodiques sont impliqués dans la régulation de l'intégration synaptique, des propriétés intrinsèques des membranes, et dans la génération de spikes de nombreux neurones pendant la dépolarisation (Zhong et al. 2007b). En bloquant l'activité des canaux sodiques, la bupivacaïne empêche la propagation du potentiel d'action des nocicepteurs des axones (Hirota et al. 1997). Des études *in vitro* ont également montré que la bupivacaïne pouvait réduire le courant cellulaire des neurones des ganglions dorsaux contrairement à la tétacaïne (Komai et al. 2005). Enfin, des études en électrophysiologie sur des coupes de moelle épinière ont montré que la bupivacaïne est capable de diminuer le courant entrant des canaux TRPV1, NMDA et non NMDA, bloquant ainsi la transmission glutamatergique spinale (Furutani et al.; Komai et al. 2005). Par conséquent, l'effet aspécifique de la bupivacaïne sur les structures nerveuses ne permet pas de conclure sur l'implication de la transduction sensorielle spinale dans la PIV à cause des effets moteurs observés.

La PIV est abolie par l'injection intrathécale de capsazépine, suggérant la participation des récepteurs TRPV1 spinaux dans la PIV. A l'inverse de la bupivacaïne, la capsazépine injectée au niveau spinal est responsable d'un blocage sensoriel sans perturber la motricité (Horvath et al. 2008). En effet, les TRPV1 sont retrouvés au niveau de la corne dorsale superficielle de la moelle épinière (Spicarova et al. 2008) et des neurones sensoriels des DRG (Caterina et al. 1997; Guo et al. 1999; Szallasi et al. 1999). Plus particulièrement, l'expression des TRPV1 dans les DRG situés au niveau des axones des fibres C et A δ (Valtschanoff et al. 2001) jouent un rôle important dans la PIV (Fromy et al. 1998; Fromy et al. 2000). Les nerfs cutanés postérieurs partant des lombaires L5-L6 innervant les cuisses sont également des fibres C (Puigdemoll-Sanchez et al. 2000; Shehab et al. 2004). Très perméables aux cations et principalement au Ca²⁺ (Caterina et al, 1997, Wu et al, 2005), l'activation des récepteurs TRPV1 spinaux va conduire à un influx de Ca²⁺ dans les synapses permettant la libération des neuropeptides et des neurotransmetteurs comme le CGRP et le glutamate dans la fente synaptique. L'abolition de la PIV observée suite à l'injection intrathécale de capsazépine qui bloque le pore d'entrée de Ca²⁺ (Bevan et al. 1992) pourrait être liée à l'absence de libération des neuropeptides et de neurotransmetteurs. En effet, les injections intrathécales de CGRP8-

37, MK-801 et NBQX ont permis de montrer que les récepteurs CGRP, NMDA et non-NMDA spinaux sont impliqués dans la PIV, suggérant le rôle du CGRP et du glutamate. Le CGRP et le glutamate sont retrouvés au niveau de la corne dorsale superficielle de la moelle épinière et des neurones sensoriels des DRG (Spicarova et al. 2008) où ils jouent différents rôles (Sun et al. 2004a; Sun et al. 2004b; Yanagidate et al. 2006). Les récepteurs NMDA et non-NMDA sont des canaux ioniques permettant l'entrée de cations au niveau post synaptique. Une fois stimulés par le glutamate, les récepteurs NMDA et non-NMDA vont permettre l'entrée de Ca^{2+} indispensable à la propagation du signal jusqu'au SNC (Yanagidate et al. 2006). D'autres études ont montré que l'activation des récepteurs TRPV1 sur les fibres afférentes primaires vont permettre d'augmenter le calcium au sein de la synapse et c'est cette augmentation calcique qui va être responsable du relargage du glutamate au niveau de la moelle épinière (Karai et al. 2004; Yang et al. 1998b) et celui des neuropeptides tels que le CGRP (Huang et al. 2002), démontrant une étroite relation entre le CGRP et les récepteurs NMDA, TRPV1 et influx calcique.

Ainsi, le développement de la PIV au niveau spinal nécessite l'activation des TRPV1 qui va permettre d'augmenter l'influx calcique au niveau pré-synaptique. Cette augmentation calcique va être responsable du relargage du glutamate et du CGRP au niveau de la fente synaptique qui vont pouvoir se fixer sur leurs récepteurs respectifs (NMDA, non-NMDA et CGRP R) afin de permettre la poursuite du message périphérique au voie supérieure.

Les injections i.t. de bupivacaïne, de capsazépine, de CGRP8-37, de MK-801 et de NBQX n'ont pas modifié les réponses vasculaires à l'acétylcholine et au nitroprussiate de sodium. La PIV ayant besoin d'une intégrité vasculaire (endothélium et muscle lisse vasculaire) (Fromy et al. 2000; Fromy et al. 2010), l'abolition de la PIV observée après les injections intrathécales s'explique par l'interruption pharmacologique de la transmission sensorielle spinale et non à une dysfonction de l'endothélium ou du muscle lisse vasculaire. L'augmentation des latences en réponse à une stimulation thermique nociceptive (tail flick) sous l'effet des bloqueurs confirme une inhibition de la transmission sensorielle spinale puisque le tail flick est un test décrit comme étant un réflexe spinal qui fait intervenir les fibres C non myélinisées (Le Bars et al. 2001). Ainsi l'ensemble de nos résultats indique que la transduction sensorielle spinale est indispensable à la PIV faisant intervenir les récepteurs TRPV1, CGRP, NMDA et non-NMDA spinaux.

Après un blocage moteur et/ou sensoriel spinal, les incidences d'escarres sont augmentées dans une même proportion, suggérant que la voie sensorielle spinale est prédominante. Des zones ischémisées plus importantes et persistantes sont retrouvées après un blocage moteur et/ou sensoriel spinal ainsi que des lésions ischémiques visibles macroscopiquement et histologiquement.

Ainsi, en absence de transduction spinale, suite au blocage des canaux Na⁺ et TRPV1, la peau n'arrive plus à se protéger contre les compressions prolongées. Ainsi, sous ces blocages, nous avons pu noter que l'écrasement de la peau était plus précoce et que l'ischémie prolongée de la peau induite par une compression montraient une absence de reperfusion. Ces deux observations concourent donc à une apparition plus élevée d'escarres suite à un blocage moteur et sensitif ou uniquement sensitif démontrant l'importance du sensitif. Cette notion de perte de la perception sensorielle et la neuropathie sensorielle sont déjà connues comme facteurs de risque et sont utilisées dans le calcul des échelles de risque d'escarres. Une étude récente sur le vieillissement avait établi cette relation entre la perte de la PIV et la neuropathie sensorielle et confirme la perte de la perception sensorielle comme un facteur de risque d'escarres (Bartus et al. 2010; Fromy et al. 2010). Les résultats de cette étude confirment qu'en absence de PIV liée à une perte de sensibilité sensorielle spinale, l'incidence est augmentée. Les patients paraplégiques sont également privés de PIV en sous-lésionnel (résultats non publiés). Or cette population est à haut risque d'escarres. Chez le rat ayant une lésion de la moelle épinière, le risque de développer des escarres après une compression de 6h est importante associé à une perte de contrôle sur l'inflammation neurogénique (Li et al. 2009). Dans notre étude, nous démontrons que bloquer la transduction sensorielle spinale peut conduire à d'importantes lésions ischémiques en réponse à une compression prolongée sur une peau saine.

Conclusion

La présence ou l'absence de PIV, mécanisme protecteur de la peau contre l'ischémie influence l'incidence d'escarres. Dans le cas d'une perte de transduction sensorielle spinale, la PIV est absente et l'incidence d'escarres est augmentée chez le rat sain.

2) La CIV

Mise en place d'un modèle animal pour l'étude de la CIV

Notre équipe et d'autres ont démontré précédemment une augmentation significative du flux sanguin cutané en réponse à l'application d'un courant galvanique non nociceptif chez l'homme (Berliner 1997b; Durand et al. 2002a; Tartas et al. 2005b). Différents facteurs sont susceptibles d'influencer la vasodilatation induite par le courant appelé CIV pour « current-induced vasodilatation » comme l'intensité et la durée du courant (Grossmann et al. 1995), le solvant utilisé (Asberg et al. 1999; Grossmann et al. 1995) mais aussi la polarité du courant (Berliner 1997b). Afin d'aller plus loin dans les mécanismes impliqués dans la CIV en utilisant certaines drogues non utilisables chez l'homme, il fallait mettre en place un modèle animal.

Le 1^{er} but consistait à rechercher l'existence d'une vasodilatation suite à une stimulation électrique chez le rat. D'après certaines études réalisées au laboratoire avec l'acétylcholine et le SNP, nous savions que les stimulations de 20s à 100 μ A chez le rat étaient insuffisantes pour induire une CIV. Ainsi, nous avons augmenté les temps d'applications du courant (60 secondes, 120 secondes, 240 secondes, et 360 secondes) et montré que l'amplitude de la CIV cathodale atteint un plateau pour une durée de 240s (Gohin et al. 2011).

Les études chez l'homme ont rapporté que la vasodilatation induite par le courant existe aux deux polarités (anode et cathode) mais que celle-ci est plus importante à la cathode (Berliner 1997a; Durand et al. 2002c). Afin de vérifier les caractéristiques des vasodilatations vis-à-vis de la polarité de l'électrode de stimulation, nous avons étudié chez le rat la vasodilatation induite par l'application d'un courant de 240s à 100 μ A en anode et en cathode. La CIV existe aux deux polarités (anode et cathode), et l'amplitude de la CIV cathodale est presque 3 fois plus grande que la CIV anodale (77% vs 26%, $P < 0.001$) pour la même intensité comme démontré chez l'homme (Berliner 1997b; Durand et al. 2002a).

Nous avons donc développé un modèle expérimental de la CIV cathodale chez le rat, avec une durée d'application de 240s et une intensité de 100 μ A. Cette stimulation a été utilisée pour poursuivre l'identification des mécanismes impliqués dans la CIV cathodale.

La vasodilatation induite par le courant et les facteurs endothéliaux (PG et NO)

La vasodilatation induite par le courant est sensible à l'aspirine et à l'indométacine, inhibiteurs non spécifiques des COX mais non sensible au celecoxib, inhibiteur spécifique des COX-2, suggérant un rôle de COX-1 (Durand et al. 2002b; Tartas et al. 2005a).

Les COX sont séparées en deux isoformes, les COX-1 et les COX-2. La COX-1 est constitutive et ubiquitaire. Elle joue des rôles de protections physiologiques dans plusieurs organes. En revanche, la COX-2 est inductible et retrouvée principalement dans des mécanismes inflammatoires (Meade et al. 1993) même si c'est une vision simpliste car COX-2 peut également être présente en conditions physiologiques (Leong et al. 1996).

Les COX sont des enzymes capables de synthétiser des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique retrouvé dans les membranes cellulaires. Ce sont les phospholipides membranaires qui libèrent l'acide arachidonique à l'aide de la phospholipase A2. Ensuite l'acide arachidonique est transformé par les COX 1 ou 2 en prostaglandines H2 intermédiaires et capables de synthétiser des facteurs vasodilatateurs (Prostacycline (PGI₂), Prostaglandine E₂...) ou vasoconstricteurs (Thromboxane A₂ ou TxA₂) via d'autres enzymes synthases.

Il existe 5 prostaglandines différentes (PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂ et TxA₂) converties par des prostaglandines synthases (PGDS, PGES, PGFS ou PGIS, ou TxAS) ayant chacune des rôles différents. Elles sont sécrétées et activent des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G. Il en existe neuf : DP1 et DP2 pour la PGD₂, EP1-4 pour la PGE₂, FP pour la PGF₂ α , IP pour la PGI₂ et TP pour le TxA₂, qui traduisent des signaux différents *via* la production des seconds messagers AMPc ou IP₃/diacylglycérol/Ca²⁺ (Malki et al. 2008) (Figure 27).

De plus, certaines prostaglandines font suite à des stimuli physiologiques, synthétisés par les COX-1, comme les TxA₂ (plaquettes), les prostacyclines (endothélium) et les PGE₂ dans le rein et l'estomac. Toutes les prostaglandines et plus particulièrement les PGE₂ et les protéases sont synthétisées par la COX-2 pendant l'inflammation (Caughey et al. 2001; Garnett 2001).

L'ensemble de ces observations sur les PGI₂ au niveau vasculaire, nous a conforté dans l'idée que la PGI₂ pouvait jouer un rôle majeur dans la vasodilatation induite par le courant cathodal (CIV) et que la voie du NO jouerait un rôle modeste. Le rôle du NO n'avait jamais jamais été étudié dans la CIV.

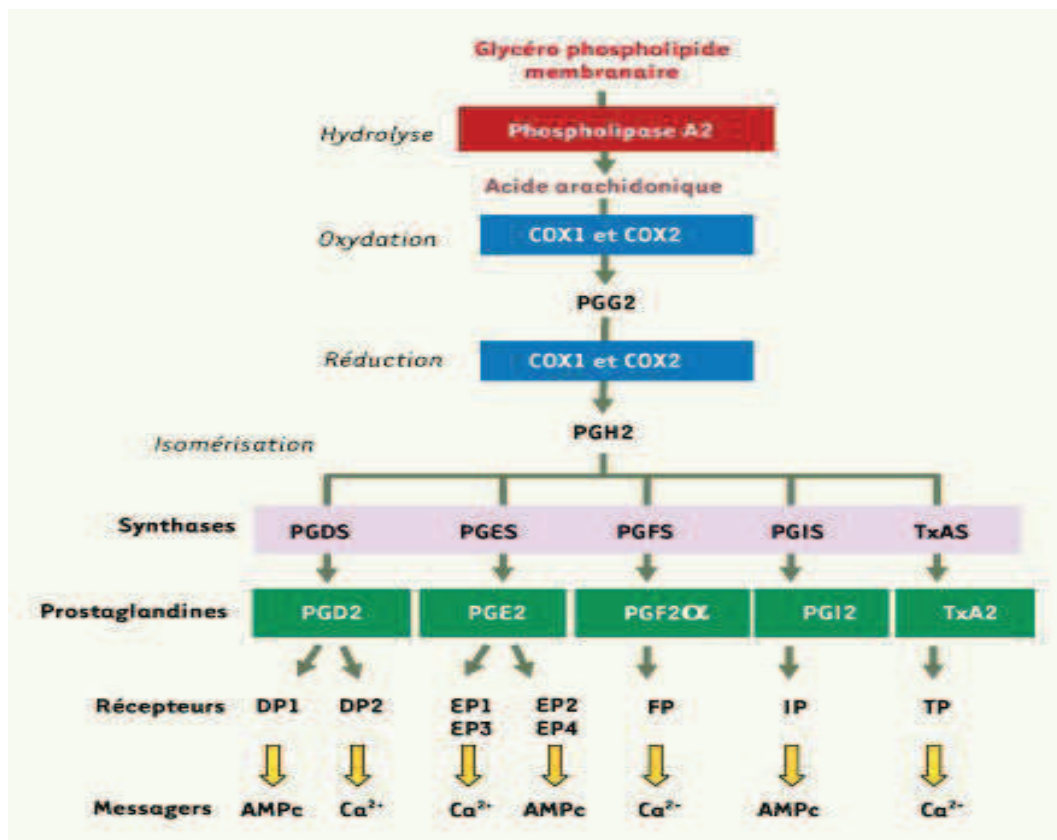


Figure 27. Synthèse et actions des prostaglandines (Malki et al. 2008).

Le but de cette étude était de démontrer l'implication des facteurs endothéliaux (NO, PGI2) dans la CIV cathodale chez les rats sains en utilisant des bloqueurs pharmacologiques qui ne pourraient pas être utilisés chez l'homme.

La méthodologie, les résultats et la discussion sont présentés succinctement. L'ensemble des résultats est présenté dans l'article:

“What can current stimulation tell us about the vascular function of endogenous prostacyclin in healthy skin *in vivo*?”

Stéphanie Gohin, Dominique Sigauo-Roussel, Agnès Conjard-Duplany, Laurence Dubourg, Jean Louis Saumet, Bérengère Fromy. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(1):237-44.

(PDF ci-après).

Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée chez des rats Wistar mâles (200-400g) sains. Les injections intraveineuses des différents inhibiteurs ont été réalisées en bolus à l'aide d'un cathéter placé en fémorale. Les drogues utilisées dans cette étude sont des inhibiteurs non spécifiques des cyclooxygénases (aspirine), des inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase COX-1 (SC560), de la COX-2 (SC58125) et de la PGI₂ synthase (PGIS) (U-51605) ainsi que le bloqueur du récepteur de la PGI₂ (récepteur IP) (CAY10441) mais aussi des inhibiteurs spécifiques des NO Synthases (LNNA). En parallèle, le dosage du 6-ketoPGF₁ α (métabolite stable des PGI₂) a été réalisé. Après l'injection des drogues, une iontophorèse d'eau désionisée a été effectuée en cathodale sur les cuisses des rats (240s ; 0.1mA). Le flux sanguin cutané a été mesuré pendant 20min.

Résultats

La CIV est réduite par les inhibiteurs spécifiques de COX-1, de PGIS ainsi que par l'antagoniste du récepteur IP. En revanche, elle reste inchangée par l'inhibiteur de la COX-2 et des NOS. Le niveau de 6-ketoPGF₁ α présent dans les biopsies de peau a été augmenté en réponse à la stimulation du courant cathodal montrant la production des PGI₂ endogènes. A l'inverse cette production de PGI₂ n'a pas été observée sous l'inhibition de COX-1 et de la PGIS.

Discussion

Cette étude prouve que la CIV cathodale est liée au relarguage de la PGI₂ endogène produite par la voie des COX-1/PGIS, et qui agit sur les récepteurs IP afin de relaxer les microvaisseaux cutanés chez les rats sains. En revanche, ni la COX-2 ni les NOS ne sont impliqués dans la CIV. Ceci présente la stimulation du courant cathodale comme une méthode intéressante pour évaluer la fonction vasculaire des PGI₂ endogènes au niveau cutané.

La CIV est un mécanisme physiologique impliquant la voie des COX-1 et non des COX-2. De nombreuses études ont montré que la voie du COX-2 était souvent associée au PGE₂ dans des cas inflammatoires et de douleurs neuropathiques (Ma et Quirion, 2008). Nos résultats sont en accord avec le rôle prédominant de COX-1 en conditions physiologiques.

Au sein du système vasculaire, les principaux vasodilatateurs endothéliaux sont le NO et la PGI₂, les iontophorèses d'acétylcholine permettent d'étudier principalement la voie du

NO (Warren 1994) même si la participation des PGs a été également rapportée chez l'homme (Kellogg et al. 2005). Nos résultats confirment le rôle prédominant du NO dans la réponse à l'ACh chez le rat. De ce fait, nos résultats sont intéressants car aucun test n'existait actuellement pour étudier la voie de la PGI₂.

Conclusion

La CIV cathodale chez le rat sain reflète la libération endogène des PGI₂ produite par la voie COX-1/PGIS dans la microcirculation cutanée. La CIV est donc une technique facile à réaliser et peu coûteuse permettant de vérifier l'intégrité des PGI₂ endogènes dans la peau.

Limites

Enfin, l'utilisation de l'aspirine qui est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) peut avoir des effets sur les canaux ASIC en plus de ces effets connus sur les COX (Voilley et al. 2001). Ainsi, des études ont démontré que les AINS (ibuprofène, aspirine) pouvaient bloquer les canaux H⁺/ASIC présents sur les neurones sensoriels et leur transcription, ce qui joue un rôle dans l'effet analgésique des mécanismes inflammatoires.

Le rôle des canaux ASIC est donc suspecté dans cette étude.

What Can Current Stimulation Tell Us about the Vascular Function of Endogenous Prostacyclin in Healthy Rat Skin *In Vivo*?

Stéphanie Gohin¹, Dominique Sigaudou-Roussel¹, Agnès Conjard-Duplany², Laurence Dubourg², Jean Louis Saumet¹ and Bérengère Fromy¹

In endothelial function, prostacyclin (PGI₂) is as important as nitric oxide (NO); however, no test assesses specifically the vascular function of endogenous PGI₂. We hypothesized that PGI₂ has a dominant role in cathodal current-induced vasodilation (CIV) described in human skin. We thus aimed to study, in physiological conditions, the PGI₂ involvement in cathodal CIV in rats in order to use pharmacological blockers that could not be used in humans. CIV was reduced by cyclooxygenase (COX)-1 and PGI₂ synthase (PGIS) and PGI₂ receptor (IP) blockers, but was unchanged by COX-2 and NO synthase (NOS) blockers. The level of 6-ketoPGF_{1α}, present in skin biopsies, measured as endogenous PGI₂, was increased by cathodal current stimulation, except under COX-1 and PGIS inhibition. This study provides evidence that cathodal CIV mainly relies on the release of PGI₂ endogenously produced through the COX-1/PGIS pathway, and then acts on IP receptors to relax the cutaneous microvessels in healthy rats. In contrast, neither COX-2 nor NOS is involved in CIV and the endogenous PGI₂ release by current stimulation. This finding shows that cathodal current stimulation could be a valuable method to assess the vascular function of endogenous PGI₂ in healthy skin.

Journal of Investigative Dermatology (2011) 131, 237–244; doi:10.1038/jid.2010.267; published online 9 September 2010

INTRODUCTION

Prostacyclin (PGI₂), the major cyclooxygenase (COX) product of arachidonic acid in the vascular endothelium, is a strong vasodilator on vascular beds (Funk, 2001; Fitzgerald, 2004) and acts as an inhibitor of platelet aggregation, a conclusion supported by an increase in thrombosis tendency in PGI₂ receptor (IP) knockout mice (Murata *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2002). In contrast, thromboxane A₂ (TxA₂), the predominant COX product of arachidonic acid in platelets, is a potent vasoconstrictor and platelet agonist. At the skin level, it has been postulated that progressive ischemic necrosis is secondary to excessive TxA₂ production, which upsets the normal PGI₂/TxA₂ balance (Robson *et al.*, 1980; Ozyazgan *et al.*, 1998). PGI₂ analogs (such as iloprost) are thus used to maintain the normal balance between PGI₂ and TxA₂ in

reconstructive surgery in order to improve the skin flap survival (Edstrom *et al.*, 1988; Akan *et al.*, 2005), as well as in Raynaud's patients with scleroderma to decrease the frequency and severity of attacks (Hachulla *et al.*, 2008). Indeed, in almost every patient with systemic sclerosis affecting the skin and other organs, microvascular damage attributed to endothelial dysfunction is one of its first pathological changes (Sgonc *et al.*, 1996; Marie and Beny, 2002; Maurer *et al.*, 2009). Besides other unclear mechanisms (Knock *et al.*, 1993), an inability of endothelial cells to synthesize or release PGI₂ (Rustin *et al.*, 1987) and an increased biosynthesis of thromboxane are thus reported in patients with systemic sclerosis (Reilly *et al.*, 1986). Therefore, in the diagnosis of endothelial dysfunction, assessing the vascular function of endogenous PGI₂ in healthy skin is as important as the vascular function of endogenous nitric oxide (NO) that could be tested by the acetylcholine (ACh)-induced vasodilation.

However, testing the vascular function of PGI₂ endogenously produced by healthy skin has never been reported. Antiplatelet aggregation assays provide an important method to test the antithrombotic benefits of PGI₂ and the vascular responses to arachidonic acid and/or PGI₂ analogs provide a measure of the efficiency of the downstream pathways. Urinary 6-ketoPGF_{1α} measurements represent a highly specific, non-invasive index of endogenous PGI₂ biosynthesis. However, these urinary measurements predominantly reflect renal PGI₂ generation under physiological conditions (Patrono *et al.*, 1982) rather than systemic biosynthesis. A large cutaneous production of endogenous PGI₂ can be

¹Neurovascular Interactions, FRE CNRS 3075, Institut des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France and ²Métabolisme et Maladies Métaboliques, INSERM U820, Faculté de Médecine RTH Laennec, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Correspondence: Bérengère Fromy, Neurovascular Interactions, FRE CNRS 3075, Institut des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, F-69373 Lyon Cedex 08, France. E-mail: berengere.fromy@recherche.univ-lyon1.fr

Abbreviations: ACh, acetylcholine; CIV, current-induced vasodilation; COX, cyclooxygenase; IP, prostacyclin receptor; i.v., intravenous; LNNA, N^G-nitro-L-arginine; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; PGI₂, prostacyclin; PGIS, prostacyclin synthase; TxA₂, thromboxane A₂

Received 24 December 2009; revised 13 July 2010; accepted 28 July 2010; published online 9 September 2010

S Gohin et al.

CIV Relies on Endogenous PGI₂ Release

evaluated by measuring 6-ketoPGF_{1α} levels in the skin as reported in mice in response to mechanical scratching inducing skin damage (Sugimoto *et al.*, 2006).

We and others previously demonstrated in humans a significant increase in cutaneous blood flow in response to non-noxious galvanic current application (Grossmann *et al.*, 1995; Durand *et al.*, 2002b), as observed after transcutaneous electrical nerve stimulation (Westerman *et al.*, 1987). This current-induced vasodilation (CIV) is sensitive to aspirin and indomethacin, non-specific inhibitors of COX (Durand *et al.*, 2002a; Tartas *et al.*, 2005b) but not sensitive to celecoxib, a specific COX-2 inhibitor (Tartas *et al.*, 2005a), suggesting a role for COX-1. The COX enzyme forms the prostaglandin endoperoxide, prostaglandin H synthase 2, which is then predominantly transformed into PGI₂ by PGI₂ synthase (PGIS) in blood vessels (Wu, 1995; Smith *et al.*, 1996). These observations strongly suggest that PGI₂ has a dominant role in this cutaneous CIV and would thus represent a model easily accessible and attractive for human studies to assess the vascular function of endogenous PGI₂ at the skin level. Testing the overall health of the microvasculature in the skin is not restricted to prevent the cutaneous disorders that upset the normal PGI₂/TxA₂ balance. Indeed, the cutaneous microvascular function provides an opportunity to study non-invasively the in-depth microvascular function (Holowatz *et al.*, 2008). Accordingly, microvascular abnormalities demonstrable in the skin microcirculation have been reported in subjects with an increased risk of coronary heart disease (Ijzerman *et al.*, 2003).

Representing a useful model easily accessible and attractive for human studies, we first aimed to define precisely the underlying mechanisms involved in cathodal CIV in physiological conditions. In this context, we studied the specific involvement of endogenous PGI₂ in cutaneous CIV and its underlying pathway in healthy rats, which provided the opportunity to use pharmacological blockers that could not be used in humans. We also studied the role of NO in cathodal CIV, a role that has not been explored previously. To assess the relevance of galvanic stimulation to ACh stimulation in physiologic studies in skin, we also studied the involvement of NO synthase (NOS) and COX pathways in the cutaneous ACh-mediated vasodilation.

RESULTS

The treatments did not change the basal cutaneous blood flow (31.3 ± 3.6 arbitrary unit), the cutaneous temperature (35.62 ± 0.02 °C) or the systolic arterial blood pressure (92 ± 5 mmHg), except the N^G-nitro-L-arginine (LNNa) treatment that induced an increase of 49 ± 10% in the systolic arterial blood pressure, showing the efficiency of the NOS inhibition.

COX/PGIS/IP involvement in cathodal CIV

Cathodal stimulation increased cutaneous blood flow in the 45% DMSO control rats, corresponding to a percent increase over the baseline of 72 ± 10%. This cathodal CIV was reduced by COX-1/2 inhibition with aspirin (14 ± 4%,

P < 0.01), COX-1 inhibition with SC560 (17 ± 8%, *P* < 0.01), and IP blockade with CAY10441 (16 ± 4%, *P* < 0.01) but unchanged by COX-2 inhibition with SC58125 (62 ± 13%) (Figures 1a, b and 2).

CIV was reduced by PGIS inhibition with U-51605 (19 ± 4%, *P* < 0.001) compared with 6% methylacetate control rats (73 ± 12%) (Figures 1c and 2).

NOS involvement in cathodal CIV

CIV was unchanged by NOS inhibition with LNNa (88 ± 18%) but abolished by the dual inhibition of COX and

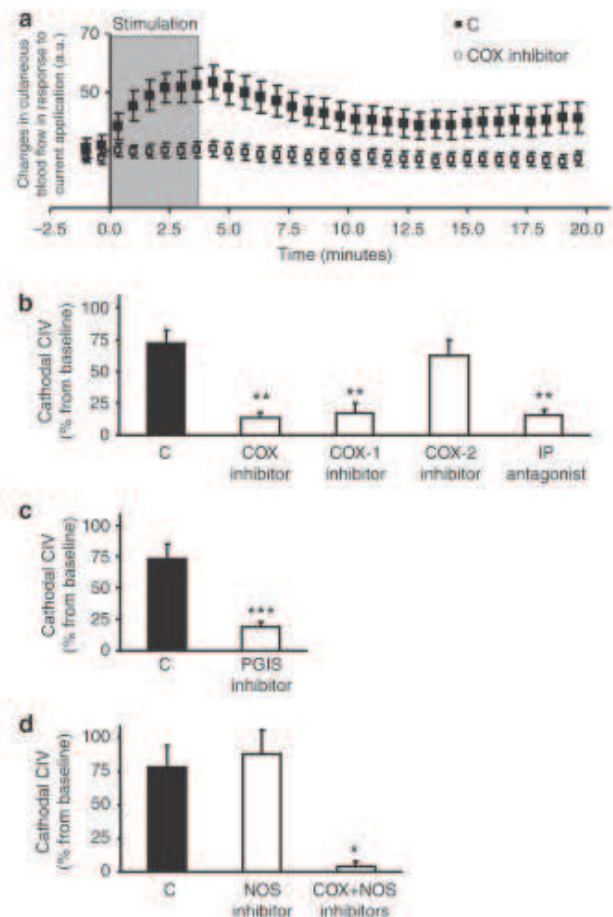


Figure 1. COX/PGIS/IP involvement in cathodal CIV. Time course of cutaneous blood flow in response to cathodal current stimulation (240 seconds, 100 μA indicated by hatched area) in 45% DMSO control rats (*n* = 10) and rats receiving COX inhibitor (aspirin, *n* = 10) (a). Mean ± SEM of CIV in response to cathodal current stimulation (240 seconds, 100 μA) in 45% DMSO control rats (*n* = 10) and rats receiving COX inhibitor (aspirin, *n* = 10), COX-1 inhibitor (SC560, *n* = 10), COX-2 inhibitor (SC58125, *n* = 10), IP receptor antagonist (CAY10441, *n* = 10) (b); 6% MA control rats (*n* = 10) and rats receiving PGIS inhibitor (U-51605, *n* = 10) (c); saline control rats (*n* = 10) and rats receiving NOS inhibitor (N^G-nitro-L-arginine, *n* = 10) and combined COX and NOS inhibitors (*n* = 5; d). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 versus respective controls. a.u., arbitrary units; C, control rat, CIV, current-induced vasodilation; COX, cyclooxygenase; IP, prostacyclin receptor; MA, methylacetate; NOS, nitric oxide synthase; PGIS, prostacyclin synthase.

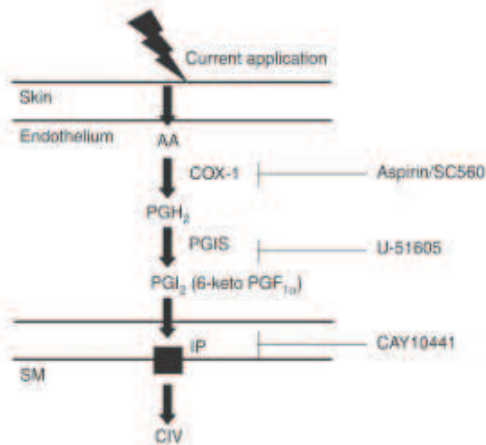


Figure 2. Proposed signaling pathway for cathodal CIV in cutaneous microcirculation in healthy rats. In response to cathodal current stimulation applied to the skin, COX-1 is likely to provide the substrate for PGIS, which catalyzes the conversion of PGH₂ to the potent vasodilator PGI₂, which then activates IP receptors present on SM, leading to CIV. The drugs that were used and the measurements of 6-ketoPGF_{1α} are also indicated. AA, arachidonic acid; CIV, current-induced vasodilation; COX, cyclooxygenase; IP, prostacyclin receptor; PGH₂, prostaglandin H synthase 2; PGI₂, prostacyclin; PGIS, prostacyclin synthase; SM, smooth muscle.

NOS with LNNA in presence of aspirin (aspirin+LNNA, 4 ± 4%, *P*<0.05) compared with saline control rats (78 ± 16%) (Figure 1d).

Measurements of 6-ketoPGF_{1α} levels

Cathodal current stimulation (240 seconds, 100 μA) increased 6-ketoPGF_{1α} levels from 481 ± 50 pg ml⁻¹ at baseline to 1,217 ± 146 pg ml⁻¹ (*P*<0.001, Figures 2 and 3) at the stimulated site, representing a percent increase from baseline of 153% in untreated rats. Current stimulation similarly increased 6-ketoPGF_{1α} levels under COX-2 inhibition with SC58125 (1,560 ± 194 pg ml⁻¹, *P*<0.001 from baseline, Figure 3) and NOS inhibition with LNNA (1,268 ± 67 pg ml⁻¹, *P*<0.001 from baseline, Figure 3). In contrast, current stimulation did not increase 6-ketoPGF_{1α} levels under COX inhibition with aspirin (153 ± 9 pg ml⁻¹), COX-1 inhibition with SC560 (144 ± 16 pg ml⁻¹), and PGIS inhibition with U-51605 (188 ± 13 pg ml⁻¹, Figure 3).

The injection of arachidonic acid strongly increased 6-ketoPGF_{1α} levels to 2,187 ± 82 pg ml⁻¹ (*P*<0.001 from baseline) in untreated rats, representing an increase of 355%.

NOS and COX involvement in the ACh-mediated vasodilation

The iontophoretic delivery of ACh in the skin increased the cutaneous blood flow from baseline in the untreated control rats, corresponding to a vasodilation of 70 ± 7% (Figure 4). This ACh-mediated vasodilation was reduced by LNNA (15 ± 6%, *P*<0.001) and by aspirin+LNNA (9 ± 1%, *P*<0.001) compared with untreated rats, but was unchanged by aspirin (69 ± 6%), SC560 (61 ± 13%) and SC58125 (72 ± 7%) (Figure 4).

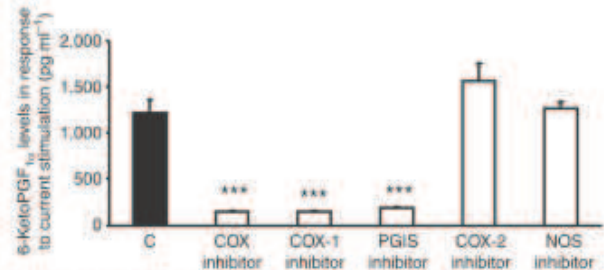


Figure 3. PGI₂ release in the skin samples in response to cathodal current stimulation. Mean ± SEM of 6-ketoPGF_{1α} levels in the skin samples in response to cathodal current stimulation (240 seconds, 100 μA) in control rats (*n* = 6) and in rats treated with a non-specific inhibitor of COX (aspirin, *n* = 6), a specific inhibitor of COX-1 (SC560, *n* = 6), a specific inhibitor of PGIS (U-51605, *n* = 6), a specific inhibitor of COX-2 (SC58125, *n* = 6), and a specific inhibitor of NOS (*N*^G-nitro-L-arginine, *n* = 6). ****P*<0.001 versus controls. C, control rats; COX, cyclooxygenase; PGI₂, prostacyclin; PGIS, prostacyclin synthase.

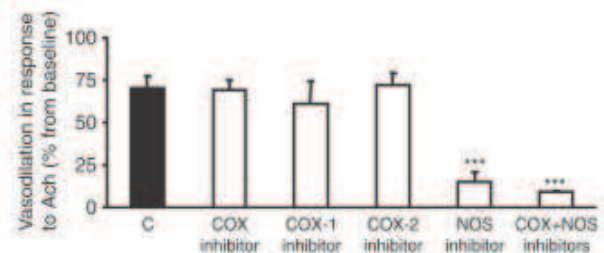


Figure 4. COX and NOS involvement in the cutaneous response to acetylcholine. Mean ± SEM of vasodilation in response to the iontophoretic delivery of acetylcholine (2%) in control rats (*n* = 10) and in rats treated with a non-specific inhibitor of COX (aspirin, *n* = 10), a specific inhibitor of COX-1 (SC560, *n* = 10), a specific inhibitor of COX-2 (SC58125, *n* = 10), a specific inhibitor of NOS (*N*^G-nitro-L-arginine, *n* = 10), and combined COX and NOS inhibitors (*n* = 5). ****P*<0.001 versus controls. Ach, acetylcholine; C, control rat; COX, cyclooxygenase; NOS, nitric oxide synthase.

DISCUSSION

This pharmacological study conducted in healthy rats provides evidence previously unreported to our knowledge that cathodal CIV mainly relies on the release of PGI₂ endogenously produced through a COX-1-dependent mechanism that includes PGIS activation, and then acts on IP receptors to relax the cutaneous microvessels (Figure 2), whereas ACh-mediated vasodilation mainly relies on NO in physiological conditions. This indicates that cathodal CIV could be a valuable method to test the role in vascular function of endogenous PGI₂ in healthy skin.

We report here that a galvanic current application induces a cutaneous vasodilation in rats, as previously reported in humans (Durand *et al.*, 2002a; Tartas *et al.*, 2005b). Although CIV exists at both electrodes (anode and cathode), we showed in rats that the amplitude of CIV is almost three times greater at the cathode (77%) than at the anode (26%) for the same charge, as previously shown in humans (Morris and Shore, 1996; Berliner, 1997; Durand *et al.*, 2002a). Moreover CIV was significantly reduced by aspirin, whereas

S Gohin et al.CIV Relies on Endogenous PGI₂ Release

it remained unchanged after specific COX-2 inhibition in rats, as we previously reported in healthy humans (Durand *et al.*, 2002a,b,c, 2003; Tartas *et al.*, 2005a,b; Rousseau *et al.*, 2008). Therefore, on the basis of these observations, it seems that cathodal CIV in anesthetized rats contains all the features that were already known for human skin. It thus supports that the rat is a reliable experimental model to further explore the underlying mechanisms involved in cathodal CIV.

Aspirin and indomethacin (data not shown) decreased cathodal CIV by almost 80%, confirming the major contribution of COX pathways, as previously reported in humans (Durand *et al.*, 2002a; Tartas *et al.*, 2005b). In contrast, acute NOS inhibition with LNNA did not modify CIV, showing that NO is not involved in cathodal CIV in these healthy conditions. Increasing evidence suggests that there is considerable "cross talk" between NO and prostaglandins biosynthetic pathways (Mollace *et al.*, 2005). Consistent with that view, arachidonic acid-induced PGI₂ synthesis was enhanced when NOS was inhibited, whereas COX inhibition with indomethacin augmented NO synthesis in cultured endothelial cells (Marcelin-Jimenez and Escalante, 2001). This interrelationship could partially explain why cathodal CIV tended to increase in the presence of NOS inhibition. Similarly, the potential upregulation of NO under COX inhibition is consistent with the fact that the remaining CIV in the presence of aspirin was abolished by LNNA, showing that NO contributed to cathodal CIV in the presence of COX inhibition. The endothelium-derived hyperpolarizing factor pathway associated with the hyperpolarization of both endothelial and vascular smooth muscle cells also contributes to endothelium-dependent relaxations. However, because endothelium-derived hyperpolarizing factor is resistant to NOS and COX inhibition, that pathway is not involved in cathodal CIV in healthy skin, as dual inhibition NOS/COX totally abolished it. Therefore, in the healthy skin of rats, the cathodal CIV mainly relies on the COX pathway, with a limited participation by NO when the COX pathway is disrupted.

In contrast to cathodal CIV, ACh-mediated vasodilation mainly relies on NO with a limited participation by PGI₂ in the healthy skin of rats. Indeed the vasodilation induced by ACh delivery into the skin was decreased by almost 80% under NOS inhibition with LNNA, showing a major contribution by NO, as previously reported in humans (Warren, 1994). In contrast, ACh-mediated vasodilation in this study was unchanged by COX inhibitors (aspirin, SC560, SC58125), showing that COX is not involved in the ACh-mediated vasodilation, as previously reported (Warren, 1994; Morris and Shore, 1996; Rousseau *et al.*, 2008). However, contradictory results showed that the ACh-mediated vasodilation was reduced under COX inhibition with aspirin or unchanged under NOS inhibition in human skin (Khan *et al.*, 1997; Noon *et al.*, 1998). In presence of aspirin, we showed that the remaining ACh-mediated vasodilation was almost abolished by LNNA, as previously reported in young adult mice (Gaubert *et al.*, 2007). Thus, although to a lesser extent than for the cathodal CIV, the cross talk between endothelial factors was also observed in the ACh-mediated vasodilation

in the healthy skin of rats. Accordingly, the combined inhibition of NOS and COX produced an even greater attenuation of ACh-induced vasodilation compared with either NOS or COX inhibition in healthy humans (Kellogg *et al.*, 2005; Lenasi and Strucl, 2008). Therefore, in the absence of blockers, ACh-mediated vasodilation mainly reflects the vascular function of endogenous NO, whereas cathodal CIV mainly reflects the vascular function of endogenous PGI₂. These two tests would be thus complementary to assess the endothelial function of the healthy skin.

Similar to the effects of COX inhibition with aspirin, we demonstrated that specific COX-1 inhibition with SC560 decreased by almost 80% cathodal CIV, whereas COX-2 inhibition with SC58125 did not change it. This clearly shows the major contribution to CIV to be the COX-1 pathway in healthy conditions. Accordingly, healthy skin was characterized by constitutively expressed COX-1 at epithelial sites constituting an essential prerequisite for skin repair (Kampfer *et al.*, 2003). In contrast, the inducible enzyme COX-2, which is not involved in CIV, is absent or rarely identified in healthy skin (Leong *et al.*, 1996; Kampfer *et al.*, 2003) and was found to be gradually increased in the case of skin damage induced by mechanical scratching (Sugimoto *et al.*, 2006). Indeed COX-2 mainly contributes to inflammation and granulation after tissue injury (Mantyh *et al.*, 2002; Kampfer *et al.*, 2003), although it is constitutively expressed in large-vessel endothelial cells as a laminar shear-inducible gene (Topper *et al.*, 1996). In addition, we demonstrated that PGIS inhibition with U-51605 also reduced cathodal CIV by about 80%, showing that PGIS is a major contributor to CIV. In agreement with these results, COX-1 but not COX-2 colocalizes with PGIS in endothelial cells (Liou *et al.*, 2000). The reduction in CIV after IP blockade with CAY10441 was comparable with that following COX-1 and PGIS inhibition, suggesting that cathodal CIV is mainly through the activation of IP receptors. Therefore, through using pharmacological drugs that are not currently available in humans, our present findings showed that the COX-1/PGIS/IP pathway is importantly involved in cathodal CIV in the healthy skin of rats.

Other than in the context of inflammation, the present findings demonstrated that cathodal current stimulation induced a significant increase in the concentration of 6-ketoPGF_{1α} in the skin at the stimulated site in untreated healthy rats, reflecting an endogenous production of PGI₂ that to our knowledge is previously unreported. This increase in 6-ketoPGF_{1α} concentration accompanying current application was not observed after COX, COX-1, or PGIS inhibition, demonstrating that the capacity of the cutaneous microvessels to generate PGI₂ in response to non-noxious current application relies mainly on the COX-1/PGIS pathway in the healthy skin of rats. In contrast, the 6-ketoPGF_{1α} concentration accompanying current application was increased (in the same proportions as in controls) in the presence of COX-2 and NOS inhibition, showing that neither COX-2 nor NOS is a major contributor to the endogenous production of PGI₂ induced by cathodal current stimulation. Cathodal CIV and the increase of 6-ketoPGF_{1α} levels were

observed in the untreated rats and under COX-2 and NOS inhibition, whereas a large attenuation of cathodal CIV and a lack of increase of 6-ketoPGF_{1 α} levels were observed under COX, COX-1, and PGIS inhibition. The cutaneous vasodilation in response to cathodal current stimulation was thus related to a significant increase of 6-ketoPGF_{1 α} levels in the skin samples, supporting the conclusion that cathodal CIV mainly relies on the endogenous production of PGI₂ in the healthy skin of rats. An even greater increase of 6-ketoPGF_{1 α} levels in the skin samples was found in response to arachidonic acid, showing a large production of PGI₂ related to an increase of 115% in the levels of cyclic AMP, the second messenger for PGI₂, without changing the basal cyclic guanosine monophosphate levels in the healthy skin of rats (data not shown). These findings are in agreement with the fact that PGI₂ is the predominant COX metabolite made by healthy endothelial cells. However, we cannot totally exclude the participation of other vasodilator prostaglandins (PGE₂, PGD₂, and PGF_{2 α}) in cathodal CIV.

In conclusion, COX-1 and PGIS inhibition strongly decreased cathodal CIV and prevented the endogenous production of PGI₂ in the healthy skin of rats, in contrast to COX-2 and NOS inhibition. Rather than actual involvement of NOS in cathodal CIV in healthy skin, its contribution was restricted to conditions when COX was inhibited. Therefore, in response to cathodal current stimulation applied to the healthy skin, COX-1 is likely to provide the substrate for PGIS, which catalyzes the conversion of prostaglandin H synthase 2 to the potent vasodilator PGI₂, which in turn activates IP receptors present on smooth muscle, leading to cathodal CIV in rats, with only a limited participation by NO. In contrast, in response to cutaneous delivery of ACh, NOS provides NO to relax vascular smooth muscle, with a limited participation by PGI₂ in the healthy skin of rats. This study indicates that cathodal current stimulation could be a valuable method to assess *in vivo* the vascular function of endogenous PGI₂, indicating the bioavailability of PGI₂ in the healthy skin in a non-invasive and easily accessible manner, whereas ACh would be a better test of the vascular function of endogenous NO. Regarding the crucial role had by PGI₂ against ischemia and thrombosis, there is a considerable relevance of galvanic stimulation with many potential applications in both research and clinical practice in a preventive approach. Whether a possible link exists between altered CIV, indicating an impairment of the PGIS/PGI₂/IP pathway at the cutaneous level, and the complications attributed to PGI₂ deficiency and/or PGI₂/TxA₂ balance disturbances deserves further studies.

MATERIALS AND METHODS

Animal instrumentation

Experiments were performed in male Wistar rats weighing 200–400 g and aged from 7 to 10 weeks. Before the experiments, animals had free access to standard laboratory food and water. Animals were housed in a regulated environment with a constant ambient temperature of 24 °C. Procedures for the maintenance and use of the experimental rats were carried out in accordance with the principles of French legislation and the experiments were approved

by the ethics committee for animal experimentation of the University of Lyon, France.

The hair was removed from the skin of the animals with a depilatory lotion to present hairless areas on the thighs area for cutaneous blood flow measurements and local current application. This depilation was performed 2 days before the experiments to avoid any influence of skin irritation at the time of the studies.

For the experiments, animals were lightly anaesthetized with Nesdonal (50 mg kg⁻¹ body weight, intraperitoneal). One femoral vein was cannulated with polyethylene catheters (PE 10) for intravenous (i.v.) administration of drugs. The rats were then placed in the prone position in an incubator warmed to maintain a stable cutaneous temperature (35.5 ± 0.1 °C) measured using a thermocouple (Physitemp BAT-12, Physitemp instruments, Clifton, NJ) placed near the current application site. Systolic arterial blood pressure was measured before the application of current and at the end of the experiment using a pressure transducer placed on the tail (XBP-1000, Kent Scientific, Torrington, CT).

Assessment of cathodal CIV

The effect on the cutaneous blood flow in response to cathodal current application of 100 μA, through deionised water, was performed on the skin of the thigh in anesthetized rats using an iontophoretic probe that was adapted to hold a laser Doppler probe (PF 4001 Master, Periflux, Perimed, Sweden). The laser Doppler signal expressed in arbitrary units was digitized with a 200 Hz sampling frequency using a computerized acquisition system (MP 100, Biopac System, CA).

Data collection started with a 1-minute control period before the cathodal stimulation and was continued for 20 minutes.

A preliminary study was performed to determine the minimal duration of current application that would induce the maximal stable amplitude of cathodal CIV in rats. We thus tested the effects of different durations of current application on cutaneous blood flow: 0 seconds (*n* = 10), 120 seconds (*n* = 10), 240 seconds (*n* = 10), and 360 seconds (*n* = 10). The amplitude of CIV increased with increasing duration of current application and reached its maximal amplitude after 240 seconds application. As CIV amplitude was not further increased following a longer duration (Figure 5a), we applied the cathodal current for 240 seconds to study the underlying mechanisms of CIV in all protocols. We also ensured in a preliminary study that cathodal CIV was greater than anodal CIV after the 240 seconds current application (77 ± 7% vs. 26 ± 6%, *P* < 0.001, Figure 5b).

Measurement of 6-ketoPGF_{1 α} levels

The release of PGI₂ was determined in skin sample (62 ± 13 mg) taken using a 8-mm diameter punch biopsy in the following conditions: basal (no current stimulation, *n* = 6), at the site of cathodal current application (240 seconds, 100 μA), and at the site of arachidonic acid injection (10 mM, 0.1 ml, subcutaneous, *n* = 6) in anesthetized untreated rats. Skin samples were also taken from the site of cathodal current application in rats treated with aspirin (50 mg kg⁻¹, i.v., *n* = 6), SC560 (2.5 mg kg⁻¹, i.v., *n* = 6), U-51605 (0.6 mg kg⁻¹, i.v., *n* = 6), SC58125 (5 mg kg⁻¹, i.v., *n* = 6), and LNNA (20 mg kg⁻¹, i.v., *n* = 6). Each skin sample was snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C. Each frozen skin sample was placed in a glass tube with 250 μl of phosphate-buffered saline

S Gohin et al.

CIV Relies on Endogenous PGI₂ Release

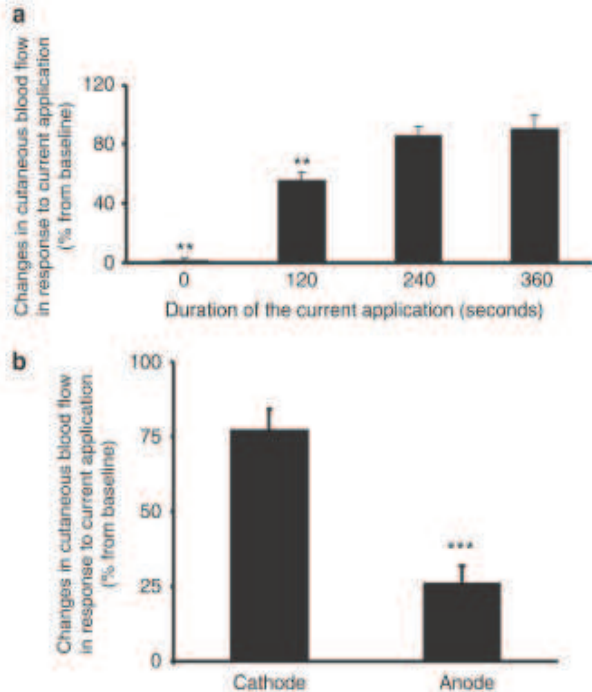


Figure 5. Effect of the cathodal current duration and polarities on current-induced vasodilation amplitude. Mean \pm SEM of the maximal cutaneous blood flow increase from baseline in response to an application of a cathodal current of 100 μ A for 0 seconds ($n = 10$), 120 seconds ($n = 10$), 240 seconds ($n = 10$), and 360 seconds ($n = 10$) in anesthetized rats (a). $**P < 0.01$ versus application of cathodal current for 360 seconds. Mean \pm SEM of the maximal cutaneous blood flow increase from baseline in response to an application of cathodal ($n = 10$) and anodal ($n = 10$) currents of 100 μ A for 240 seconds in anesthetized rats (b). $***P < 0.001$ versus cathodal current.

solution containing 100 μ g ml⁻¹ of indomethacin to inhibit further synthesis of prostanoids. The tube was placed on dry ice and the tissue was homogenized in a Potter. The resulting insoluble protein was removed by centrifugation (2,000 \times g for 10 minutes) at 4 $^{\circ}$ C.

The amounts of 6-ketoPGF_{1 α} present in the extracts were measured as an estimate of PGI₂ using a competitive enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Absorbance of the samples and of the corresponding standard curve were read on a PowerWave X5 microplate spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) at 410 nm. The lower limit of detection was 6 pg ml⁻¹ for 6-ketoPGF_{1 α} .

COX/PGIS/IP involvement in cathodal CIV

A pharmacological approach was used to identify the involvement of the underlying signaling pathway in CIV. A cathodal current (240 seconds, 100 μ A) was applied to the skin in rats treated with a non-specific COX-1/COX-2 inhibitor (aspirin, 50 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$), a specific inhibitor of COX-1 (SC560, 2.5 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$), a specific inhibitor of COX-2 (SC58125, 5 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$), a specific inhibitor of PGIS (U-51605, 0.6 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$), or a specific antagonist of IP receptor (CAY10441, 6 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$). The treated rats were compared with control rats that received the same volume of the corresponding vehicle:

DMSO (i.v., $n = 10$) for aspirin; SC560, SC58125, and CAY10441; and methylacetate (i.v., $n = 10$) for U-51605.

NOS involvement in cathodal CIV

In addition to PGI₂, the potent vasodilator NO also counteracts leukocyte adhesion to the endothelium (Kubes *et al.*, 1991; Gauthier *et al.*, 1995) and platelet aggregation (de Graaf *et al.*, 1992). To examine the NOS involvement in CIV, a cathodal current (240 seconds, 100 μ A) was applied to the skin in rats treated with an inhibitor of the constitutive NOS (LNNA, 20 mg kg⁻¹, i.v.) (Tabrizi-Fard and Fung, 1996) alone (only LNNA, $n = 10$) and in the presence of aspirin (aspirin + LNNA, $n = 5$). The saline control rats ($n = 10$) received the same volume of saline (i.v.) as the treated rats.

NOS and COX involvement in the ACh-mediated vasodilation

To examine the endothelium-dependent endogenous NO vasodilator capacities of the cutaneous microvessels, cutaneous blood flow was measured in response to anodal iontophoretic delivery (100 μ A; 20 seconds) of ACh (2% dissolved in deionised water) in rats treated with a non-specific COX inhibitor (aspirin, 50 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$), a specific inhibitor of COX-1 (SC560, 2.5 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$), a specific inhibitor of COX-2 (SC58125, 5 mg kg⁻¹, i.v., $n = 10$), and a NOS inhibitor (LNNA, 20 mg kg⁻¹, i.v.) alone (only LNNA, $n = 10$) and in combination with aspirin (aspirin + LNNA, $n = 5$). The control rats ($n = 10$) received the same volume of saline as the treated rats.

Drugs

Aspirin, LNNA, ACh, arachidonic acid, methylacetate, and DMSO were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). SC560, SC58125, U-51605, and CAY10441 was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Cathodal current stimulation and delivery of ACh were assessed 30 minutes after the injection of aspirin, CAY10441 or DMSO; 15 minutes after SC560, SC58125, LNNA, or saline; and 60 minutes after U-51605 or methylacetate. All of these drugs have been used to produce the optimal desired pharmacological effect according to previous protocols (Bayorh *et al.*, 2002; von der Weid *et al.*, 2004; Atar *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2008), as well as in preliminary studies from our laboratory (data not shown).

Data analysis

The signals from the laser Doppler probe were averaged every 10 seconds to reduce instantaneous variability owing to vasomotion. Results are expressed as means \pm SEM. Baseline values were calculated as the average over the 1-minute baseline period before the current application or ACh delivery. Vasodilation was then reported as the maximal percentage increase in the cutaneous blood flow above the baseline in response to cathodal current stimulation (CIV) or ACh delivery.

Student's paired *t*-test was used to evaluate the significance of changes within a group. To determine the significance of results between two groups, we used an unpaired Student *t*-test, whereas we used an analysis of variance test followed by *post hoc* Dunnett's test to compare more than two groups (rats receiving the vehicle as controls). A two-tailed *P*-value < 0.05 was regarded as statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Gregory James, Audrey Jusset-Lamaugamy, and Christine Ranquet for technical support, and Professor John Johnson for English language editing.

REFERENCES

Akan M, Cakir B, Misirlioglu A et al. (2005) Effects of clopidogrel and high dose aspirin on survival of skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 39:7-10

Atar S, Ye Y, Lin Y et al. (2006) Atorvastatin-induced cardioprotection is mediated by increasing inducible nitric oxide synthase and consequent S-nitrosylation of cyclooxygenase-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1960-8

Bayorh MA, Eatman D, Walton M et al. (2002) Post-suspension hypotension is attenuated in Sprague-Dawley rats by prostacyclin synthase inhibition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:511-7

Berliner MN (1997) Skin microcirculation during tapwater iontophoresis in humans: cathode stimulates more than anode. *Microvasc Res* 54:74-80

Cheng Y, Austin SC, Rocca B et al. (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296:539-41

de Graaf JC, Banga JD, Moncada S et al. (1992) Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85:2284-90

Durand S, Fromy B, Bouye P et al. (2002a) Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0,10mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms. *J Vasc Res* 39:59-71

Durand S, Fromy B, Bouye P et al. (2002b) Vasodilatation in response to repeated anodal current application in the human skin relies on aspirin-sensitive mechanisms. *J Physiol* 540:261-9

Durand S, Fromy B, Koitka A et al. (2002c) Oral single high-dose aspirin results in a long-lived inhibition of anodal current-induced vasodilatation. *Br J Pharmacol* 137:384-90

Durand S, Fromy B, Tartas M et al. (2003) Prolonged aspirin inhibition of anodal vasodilation is not due to the trafficking delay of neural mediators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R155-61

Edstrom LE, Balkovich M, Slotman GJ (1988) Effect of ischemic skin flap elevation on tissue and plasma thromboxane A2 and prostacyclin production: modification by thromboxane synthetase inhibition. *Ann Plast Surg* 20:106-11

Fitzgerald GA (2004) Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 351:1709-11

Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-5

Gaubert ML, Sigaudou-Roussel D, Tartas M et al. (2007) Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an *in vivo* back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol* 585:617-26

Gauthier TW, Scalia R, Murohara T et al. (1995) Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1652-9

Grossmann M, Jamieson ML, Kellogg DL Jr et al. (1995) The effect of iontophoresis on the cutaneous vasculature: evidence for current-induced hyperemia. *Microvasc Res* 50:444-52

Hachulla E, Launay D, Hatron PY (2008) Iloprost for the treatment of systemic sclerosis. *Presse Med* 37:831-9

Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL (2008) The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol* 105:370-2

Ijzerman RG, de Jongh RT, Beijs MA et al. (2003) Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur J Clin Invest* 33:536-42

Kampfer H, Brautigam L, Geisslinger G et al. (2003) Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. *J Invest Dermatol* 120:880-90

Kellogg DL Jr, Zhao JL, Coey U et al. (2005) Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *J Appl Physiol* 98:629-32

Khan F, Davidson NC, Littleford RC et al. (1997) Cutaneous vascular responses to acetylcholine are mediated by a prostanoid-dependent mechanism in man. *Vasc Med* 2:82-6

Knock GA, Terenghi G, Bunker CB et al. (1993) Characterization of endothelin-binding sites in human skin and their regulation in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 101:73-8

Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651-5

Lenasi H, Struel M (2008) The effect of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition on cutaneous microvascular reactivity. *Eur J Appl Physiol* 103:719-26

Leong J, Hughes-Fulford M, Rakhlin N et al. (1996) Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res* 224:79-87

Liou JY, Shyue SK, Tsai MJ et al. (2000) Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 275:15314-20

Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M et al. (2002) Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2:201-9

Marcelin-Jimenez G, Escalante B (2001) Functional and cellular interactions between nitric oxide and prostacyclin. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 129:349-59

Marie I, Beny JL (2002) Endothelial dysfunction in murine model of systemic sclerosis: tight-skin mice 1. *J Invest Dermatol* 119:1379-87

Maurer B, Busch N, Jungel A et al. (2009) Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation* 120:2367-76

Mollace V, Muscoli C, Masini E et al. (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 57:217-52

Morris SJ, Shore AC (1996) Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms. *J Physiol* 496:531-42

Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T et al. (1997) Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678-82

Noon JP, Walker BR, Hand MF et al. (1998) Studies with iontophoretic administration of drugs to human dermal vessels *in vivo*: cholinergic vasodilatation is mediated by dilator prostanoids rather than nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol* 45:545-50

Ozyazgan I, Tercan M, Melli M et al. (1998) Eicosanoids and inflammatory cells in frostbitten tissue: prostacyclin, thromboxane, polymorphonuclear leukocytes, and mast cells. *Plast Reconstr Surg* 101:1881-6

Patrono C, Pugliese F, Cahaattoni G et al. (1982) Evidence for a direct stimulatory effect of prostacyclin on renin release in man. *J Clin Invest* 69:231-9

Reilly IA, Roy L, Fitzgerald GA (1986) Biosynthesis of thromboxane in patients with systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *Br Med J (Clin Res Ed)* 292:1037-9

Robson MC, DelBeccaro EJ, Hegggers JP et al. (1980) Increasing dermal perfusion after burning by decreasing thromboxane production. *J Trauma* 20:722-5

Rousseau P, Tartas M, Fromy B et al. (2008) Platelet inhibition by low-dose aspirin but not by clopidogrel reduces the axon-reflex current-induced vasodilation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1420-6

Rustin MH, Bull HA, Machin SJ et al. (1987) Serum from patients with Raynaud's phenomenon inhibits prostacyclin production. *J Invest Dermatol* 89:555-9

S Gohin et al.

CIV Relies on Endogenous PGI₂ Release

- Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H *et al.* (1996) Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 98:785-92
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271:33157-60
- Sugimoto M, Arai I, Futaki N *et al.* (2006) Role of COX-1 and COX-2 on skin PGs biosynthesis by mechanical scratching in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:1-8
- Tabrizi-Fard MA, Fung HL (1996) Pharmacokinetics and steady-state tissue distribution of L- and D-isomers of nitroarginine in rats. *Drug Metab Dispos* 24:1241-6
- Tartas M, Bouye P, Koitka A *et al.* (2005a) Early vasodilator response to anodal current application in human is not impaired by cyclooxygenase-2 blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1668-73
- Tartas M, Bouye P, Koitka A *et al.* (2005b) Cathodal current-induced vasodilation to single application and the amplified response to repeated application in humans rely on aspirin-sensitive mechanisms. *J Appl Physiol* 99:1538-44
- Topper JN, Cai J, Falb D *et al.* (1996) Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10417-22
- von der Weid PY, Hollenberg MD, Fiorucci S *et al.* (2004) Aspirin-triggered, cyclooxygenase-2-dependent lipoxin synthesis modulates vascular tone. *Circulation* 110:1320-5
- Warren JB (1994) Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light. *FASEB J* 8:247-51
- Westerman RA, Widdop RE, Hogan C *et al.* (1987) Non-invasive tests of neurovascular function: reduced responses in diabetes mellitus. *Neurosci Lett* 81:177-82
- Wu KK (1995) Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 33:179-207
- Yamada Y, Yamauchi D, Usui H *et al.* (2008) Hypotensive activity of novokinin, a potent analogue of ovokinin(2-7), is mediated by angiotensin AT₂ receptor and prostaglandin IP receptor. *Peptides* 29:412-8

La vasodilatation induite par le courant et les fibres capsaïcino-sensibles

La CIV est considérée comme étant un mécanisme neurovasculaire de type « axone réflexe ». Les études menées chez l'homme ont mis en évidence la perte de la CIV suite à un traitement chronique à la capsaïcine permettant de conclure que les fibres capsaïcino-sensibles sont indispensables dans le développement de cette vasodilatation (Durand et al. 2002a). L'activation de ces fibres en périphérie peut être provoquée par divers stimuli, y compris le pH acide, la chaleur, et la capsaïcine. L'hypothèse de l'acidification de la peau a été proposée comme initiateur dans l'activation des fibres nerveuses lors des études chez l'homme (Durand et al. 2002a; Durand et al. 2002c). Il est connu que les protons sont de puissants excitateurs des nocicepteurs présents sur les fibres capsaïcino-sensibles. En effet des études in vitro sur des explants de nerf et de peau et avec un changement de pH dans un bain ont montré l'activation des nocicepteurs des fibres C et A δ impliquées dans la douleur et l'hyperalgésie (Steen et al. 1993; Steen et al. 1992). Dans ces conditions, les seuils d'activation des fibres sont compris entre pH 6.9 et pH 6.1, avec une fréquence maximale de décharges pour pH 5.2 (Steen et al. 1992). Les ASIC (Acid-sensing ion channels) sont activés plutôt par des baisses de pH modérés alors que les TRPV1 sont activés par une acidose plus importante avec des valeurs de pH en dessous de 6 (Caterina et al. 2001; Diochot et al. 2007; Lingueglia 2007; Wemmie et al. 2006). Les nocicepteurs appartiennent à plusieurs familles mais en pratique ce sont les canaux TRPV1 et ASIC qui peuvent être directement activés par les protons et qui sont les plus étudiés. Ces canaux sont par exemple responsables de l'activation de la nociception liée à l'acidification extracellulaire dans le système sensoriel (Fischer et al. 2003).

La capsaïcine est un ligand de haute affinité, connue pour avoir ses effets en se liant au récepteur TRPV1 (Caterina et al. 2001; Szallasi et al. 1999), exprimé sur les fibres C peptidergiques et non-peptidergiques (Caterina et al. 1997). La capsazépine (Walpole et al. 1994) est un analogue du produit chimique de la capsaïcine, qui agit en tant qu'antagoniste concurrentiel de la capsaïcine (Bevan et al. 1992), un ligand de haute-affinité pour le TRPV1, présent dans divers tissus (Szallasi et al. 1993), suggérant qu'il puisse agir sur son site ou le fermer.

La famille des ASIC « acid-sensing ion channel » est un canal ionique Na⁺/H⁺ de la famille degenerin /ENaC. De plus en plus d'études démontrent l'implication des canaux ASIC dans la nociception liée à l'acidification extracellulaire dans le système sensoriel (Deval et al.

2010). Actuellement, la famille des ASIC compte six isoformes: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, et ASIC4 (Chen et al. 1998; Lingueglia et al. 1997; Waldmann et al. 1997a; Waldmann et al. 1997b). L'inhibiteur non spécifique des ASIC le plus couramment utilisé est l'amiloride, pouvant également bloquer l'échangeur NHE-1 présent dans les keratinocytes et l'épiderme (Masereel et al. 2003). De plus, il a été montré qu'il joue un rôle très important dans la régulation du pH intracellulaire permettant l'acidification de la couche cornée (Behne et al. 2002). Ainsi pour discriminer le NHE-1, un inhibiteur spécifique a été développé, la cariporide (Hachem et al. 2005).

Les fibres capsaïcino-sensibles activées peuvent libérer de nombreux neuropeptides (Franco-Cereceda et al. 1992; Santicioli et al. 1993). Les plus couramment retrouvés au niveau des terminaisons des fibres sensorielles et impliqués dans la nociception sont le CGRP et les neurokinines (substance P, NKA et NKB). Le CGRP est un puissant vasodilatateur et se fixe sur son récepteur CGRP R. La substance P est colocalisée dans la peau avec le CGRP (Gibbins et al. 1985) ; elle a des propriétés vasodilatatrices et se fixe préférentiellement sur le récepteur NK1 (neurokinine 1) largement impliqué dans la nociception (Cao et al. 1998). Des études réalisées avec un courant électrique de forte intensité (30mA) ont montré l'implication du CGRP et de la SP (Sauerstein et al. 2000b).

Nous avons émis l'hypothèse que la stimulation électrique cathodale active les canaux-récepteurs cutanés vanilloïdes transitoires de type 1 (TRPV1) et/ou les canaux ioniques sensibles à l'acidose (ASIC) présents sur les fibres capsaïcino-sensibles induisant la CIV cathodale grâce à la libération des neuropeptides tels que le CGRP et la SP.

Le but de cette étude est de préciser l'implication des canaux TRPV1 et ASIC cutanés ainsi que la participation des récepteurs cutanés au CGRP et à la SP dans la vasodilatation induite par le courant chez le rat sain.

La méthodologie, les résultats et la discussion sont présentés succinctement car l'ensemble des résultats est présenté sous forme d'article soumis à «*Journal of Applied Physiology*».

Article soumis

“Antagonism of TRPV1 and ASIC channels attenuates cutaneous vasodilator response to cathodal stimulation in healthy rats”

Stéphanie Gohin, Dominique Sigauco-Roussel, Jean Louis Saumet, Bérengère Fromy.

Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée chez des rats Wistar mâles (200-400g) sains. Les rats ont été traités avec de la capsazépine (3 mg/kg, s.c., n=10), avec de l'amiloride (50 mg/kg, s.c., n=10); du CGRP8-37 (0.1 mg/kg, s.c., n=10) et du SR140333 (0.1 mg/kg, s.c., n=10) pour bloquer les canaux/récepteurs TRPV1, ASIC, CGRP et NK1, respectivement. La CIV a été évalué en mesurant le flux sanguin cutané grâce au laser Doppler pendant 20 minutes en réponse à l'application du courant cathodale (240s; 100 μ A) sur les cuisses des rats sains anesthésiés (thiopental, 50 mg/kg, i.p.).

Résultats

La CIV a été totalement abolie sous EMLA (anesthésique local).

La CIV cathodale a été fortement diminuée par le capsazépine (12 \pm 2% vs 54 \pm 6%), l'amiloride (19 \pm 8% vs 61 \pm 6%), le CGRP8-37 (15 \pm 6% vs 61 \pm 6%) et le SR140333 (9 \pm 5% vs 54 \pm 6%) par rapport à leurs témoins respectifs (P<0.001 vs tous les traitements).

Discussion

La CIV est abolie par l'EMLA (anesthésique locale appliqué sur la peau) chez le rat comme chez l'homme (Durand et al. 2002a).

Les résultats de cette étude ont montré que les canaux/récepteurs TRPV1, ASIC, CGRP et NK1 sont impliqués dans la CIV cathodale chez le rat sain.

Cette étude a également montré que le courant diminue le pH de surface (6.1 à 5.7), correspondant à une légère acidose qui pourrait être l'initiateur de l'activation des canaux TRPV1 et ASIC. C'est la première étude intégratrice réalisée sur des rats sains qui prouve que la vasodilatation cutanée en réponse à la stimulation électrique cathodale est médiée par l'activation des canaux cutanés TRPV1 et ASIC. La participation des récepteurs CGRP et NK1 suggère que la CIV cathodale est le résultat du CGRP et de la SP libérés par les fibres capsaïcino-sensibles activées. Par conséquent la CIV cathodale permet l'évaluation de la fonction neurovasculaire sensorielle de la peau.

Conclusion

La CIV cathodale chez le rat sain est un mécanisme neurovasculaire dépendant des canaux cutanés TRPV1 et ASIC et des récepteurs cutanés au CGRP et à la SP.

Article soumis

Antagonism of TRPV1 and ASIC channels attenuates cutaneous vasodilator response to cathodal stimulation in healthy rats

Stéphanie Gohin¹, Dominique Sigaudou-Roussel¹, Jean Louis Saumet¹, Bérengère Fromy¹.

¹Neurovascular interaction, FRE CNRS 3310, UCBL1, University of Lyon 1, France.

Running title: Underlying mechanisms of cathodal CIV in healthy rats

Corresponding author: Berengere Fromy, PhD

FRE CNRS 3310; Dysfonctionnement de l'Homéostasie Tissulaire et Ingénierie

Thérapeutique, IBCP, 7 passage du vercors, F-69367 Lyon cedex, France.

Université Lyon 1, Lyon, France.

Telephone number: (33) 472 722658

Email: berengere.fromy@univ-lyon1.fr

Abstract

Cutaneous current-induced vasodilation (CIV) in response to galvanic current application is an integrative model of neurovascular interaction that relies on capsaicin-sensitive fiber activation. We tested the hypothesis that cathodal stimulation activates cutaneous transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channels and/or acid-sensing ion channels (ASIC) to excite capsaicin-sensitive fibers inducing cathodal CIV by releasing calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP). To assess cathodal CIV, we measured cutaneous blood flow using laser Doppler flowmetry for 20 min following cathodal current application (240s, 100 μ A) on the skin of the thigh in anesthetised healthy rats for 20 min. CIV was studied in rats treated with capsazepine and amiloride to inhibit TRPV1 and ASIC channels, respectively; CGRP8-37 and SR140333 to antagonise CGRP and neurokinin-1 (NK1) receptors, respectively; compared to their respective controls. Cathodal CIV was attenuated by capsazepine ($12\pm 2\%$ vs $54\pm 6\%$, $P<0.001$), amiloride ($19\pm 8\%$ vs $61\pm 6\%$, $P<0.01$), CGRP8-37 ($15\pm 6\%$ vs $61\pm 6\%$, $P<0.001$) and SR140333 ($9\pm 5\%$ vs $54\pm 6\%$, $P<0.001$). This is the first integrative study performed in healthy rats showing that cutaneous vasodilation in response to cathodal stimulation is initiated by activation of cutaneous TRPV1 and ASIC channels. The involvement of CGRP and NK1 receptors suggests that cathodal CIV is the result of CGRP and SP released through activated capsaicin-sensitive fibers. Therefore cathodal CIV could be a valuable method to assess sensory neurovascular function in the skin, which would be particularly relevant to evaluate the presence of small nerve fiber disorders and the effectiveness of treatments.

Key words: cutaneous afferent, microcirculation, electrical stimulation

INTRODUCTION

A significant increase in cutaneous blood flow in response to non-noxious galvanic current application is seen in humans (Durand et al. 2002b; Ferrell et al. 2002; Grossmann et al. 1995), as observed following transcutaneous electrical nerve stimulation (Westerman et al. 1987). Small sensory afferents appear to be involved in the vascular response to current application (Berliner 1997b; Hamdy et al. 2001). Accordingly, we previously showed in healthy humans that current-induced vasodilation (CIV) resulted primarily from neural excitation and mainly through activation of capsaicin-sensitive fibers, since it is abolished under local anesthesia and severely impaired after chronic capsaicin desensitization (Durand et al. 2002a). However the question as to the mechanisms involved in stimulating the sensory nerves in response to iontophoretic current application to the skin remains unresolved. Although initially viewed as a source of difficulty in interpreting vascular responses to the iontophoresis of pharmacological agents, this capsaicin-sensitive vascular response to galvanic current application represents an easy integrative model to test the sensory neurovascular interaction in the skin. Because such assessment has the potential to provide information on the presence of neurovascular disorders and the effectiveness of treatment and may even serve as a means for the early detection of disease onset, a better understanding of the underlying mechanisms involved in CIV is thus of major interest. Therefore, the present study was designed to elucidate the up-stream and down-stream mechanisms related to the activation of the capsaicin-sensitive fibers involved in CIV.

Although iontophoretic current applications are not painful, it is likely that the sensitivity of CIV to local anesthesia and chronic treatment with capsaicin reflects, at least in part, the stimulation of cutaneous C-fiber nociceptors that trigger vasodilation through an axon reflex (Berliner 1997b; Hamdy et al. 2001). Indeed, the axon reflex mechanism activates capsaicin-sensitive fibers by acting directly on cutaneous nociceptors such as transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) and/or acid-sensing ion channels (ASIC), which are abundantly expressed in human epidermis and keratinocytes (Inoue et al. 2002; Jiang et al. 2006; Southall et al. 2003; Yamamura et al. 2008). We thus suggested that the activation of the capsaicin-sensitive fibers could result from the excitation of cutaneous TRPV1 and/or ASIC channels in response to the cathodal current stimulation. Regarding down-stream mechanisms related to the activation of the capsaicin-sensitive fibers, it is well known that activated primary afferent endings commonly release calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP), two potent vasodilators that are co-localized in subepidermal and

epidermal capsaicin-sensitive fibers (Gibbins et al. 1985). Indeed the capsaicin-sensitive sensory system subserves a dual sensory-efferent function whereby initiation of afferent signals and neuropeptide release are coupled at the same nerve endings, as previously reviewed (Szolcsanyi 2004). In the skin, direct evidence of CGRP and SP release has been obtained using capsaicin, as well as by antidromic electrical nerve stimulation (Kilo et al. 1997; Kress et al. 1999; Schmelz et al. 2001).

Taken together, the above observations led us to hypothesize that cathodal stimulation stimulates cutaneous TRPV1 and/or ASIC channels, leading to activation of capsaicin-sensitive fibers that, in turn, release vasoactive neuropeptides (CGRP and SP) to generate cutaneous vasodilation (cathodal CIV). Therefore, we used a pharmacological approach to study the specific involvement of the cutaneous TRPV1 and ASIC channels, as well as the involvement of receptors for CGRP and SP in cathodal CIV in healthy rat skin.

METHODS

Animal preparation

Experiments were performed in male Wistar rats weighing 200-400g aged from 7 to 10 weeks. Before the experiments, animals had free access to standard laboratory food and water and were housed in a regulated environment with a constant ambient temperature of 24°C. Procedures for the maintenance and use of animals were carried out in accordance with the principles of French legislation and the experiments were approved (n°0224) by the ethics committee for animal experimentation of the University of Lyon, France.

The hair was removed from the skin of the thighs with a depilatory lotion to present hairless areas for cutaneous blood flow measurements and local current application. This depilation was performed two days before the experiments to avoid skin irritation at the time of the studies.

For the experiments, animals were anaesthetized with Nesdonal (50 mg/kg body weight, i.p.). The rats were then placed in the prone position in an incubator (MP4SI, Mediprema, Chambray les Tours, France) warmed to maintain a stable cutaneous temperature throughout the experiment ($35.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$) measured using a thermocouple (Physitemp BAT-12, Physitemp instruments INC, Clifton, USA) placed near the site selected for current application. Systolic arterial blood pressure was measured prior to current application and at the end of the experiment using a pressure transducer placed on the tail (XBP-1000, Kent Scientific, Torrington, USA). Only rats with stable systolic arterial blood pressure (difference

between basal and final values less than 20 mmHg) were included in the study to ensure hemodynamic stability.

Assessment of cathodal CIV

The cutaneous blood flow response to cathodal current application (240s, 100 μ A), through deionised water, was measured from the skin of the thigh of the anaesthetised rats using a iontophoretic device that was adapted to hold a laser Doppler probe (PF 4001 Master, Periflux, Perimed, Sweden) at the center of the stimulated site. The laser Doppler signals were expressed in arbitrary units (a.u.).

For the purpose of the study, all pharmacological agents were administered into the skin at the site of the current stimulation using either topical treatment or subcutaneous (s.c.) injections.

Animals were sacrificed at the end of the experiment by an overdose of the anaesthetic agent.

Protocol 1: Nerve fiber involvement in cathodal CIV

To examine the involvement of nerve fibers, CIV was assessed in rats treated with a local application of a topical anaesthetic (EMLA cream, $n=10$) and in control rats ($n=10$) receiving a local application of a placebo cream (paraffin/vaseline mixture). EMLA and placebo were applied topically to the skin 30 minutes prior to the start of the experiment. As previously used in humans (Durand et al. 2002a), this exposure time to EMLA was chosen to block neural activity and avoid its vasodilator effect observed with prolonged application (Bjerring et al. 1989).

Protocol 2: TRPV1 channel involvement in cathodal CIV

To examine the involvement of TRPV1 channels, CIV was assessed in rats treated with a TRPV1 antagonist (capsazepine, 3 mg/kg, s.c., $n=10$) as previously used in rats (Wang et al. 2008). The control rats received the same volume of the corresponding vehicle (DMSO 45%, s.c., $n=10$) than the treated rats. Capsazepine and DMSO 45% were injected 20 minutes prior to the start of the experiment.

Protocol 3: ASIC channel involvement in cathodal CIV

To examine the involvement of ASIC, CIV was assessed in rats treated with a non specific ASIC inhibitor (amiloride, 50 mg/kg, s.c., $n=10$) as previously used in rats (White et al. 2002) and in control rats that received the same volume of the corresponding vehicle (saline, s.c., $n=10$) than the treated rats. In addition to its ability to inhibit ASIC channels, amiloride is a sodium-proton exchange (NHE) inhibitor (Masereel et al. 2003). To control for that property of amiloride, we also tested the effect on CIV of the potent NHE inhibitor cariporide (HOE 642, 0.2 mg/kg, s.c., $n=10$), as previously used in rats (Aye et al. 1997). Amiloride, cariporide and saline were injected 30 minutes prior to the start of the experiment.

Protocol 4: CGRP receptor involvement in cathodal CIV

To examine the involvement of CGRP receptors, CIV was assessed in rats treated with CGRP₈₋₃₇ (0.1 mg/kg, s.c., $n=10$) as previously used in rats (Fromy et al. 2000). Control rats received the same volume of the corresponding vehicle (saline, s.c., $n=10$) as the treated rats. CGRP₈₋₃₇ and saline were injected 10 minutes prior to the start of the experiment.

Protocol 5: NK1 receptor involvement in cathodal CIV

To examine the involvement of NK1 receptors, CIV was assessed in rats treated with a specific NK1 receptor antagonist (SR140333, 0.2 mg/kg, s.c., $n=10$) as previously used in rats (Fromy et al. 2000). Control rats received the same volume of the corresponding vehicle (DMSO 45%, s.c., $n=10$) as the treated rats. SR140333 and DMSO 45% were injected 10 minutes prior to the start of the experiment.

Drugs

Capsazepine, amiloride, and DMSO were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Cariporide and CGRP₈₋₃₇ were purchased from Aventis pharma (Frankfurt, Germany) and Polypeptide Group (Strasbourg, France), respectively. SR140333 (lot PG 13 2566) was kindly provided by Dr Emonds-Alt (Sanofi® Recherche, Montpellier, France).

Statistical analysis

Data were digitized with a 200 Hz sampling frequency using a computerized acquisition system (MP 100, Biopac System Inc, California, USA). Data collection started with a 1-min baseline period prior to cathodal stimulation and was continued for 20 min. The

signals from the laser Doppler probe were averaged every 10s to reduce instantaneous variability owing to vasomotion. Vasodilation (CIV) referred to the percentage increase in cutaneous blood flow over the baseline in response to the cathodal stimulation.

Student's paired t test was used to evaluate the significance of changes within a group. To compare cathodal CIV between two groups, we used an unpaired Student t-test, whereas we used an analysis of variance (ANOVA) test followed by post hoc Bonferroni's test to compare more than 2 groups (rats receiving the vehicle as controls). We used a two-way ANOVA followed by the Bonferroni's correction to measure the effects of two factors simultaneously (time and treatment) on the cutaneous blood flow response to cathodal stimulation. A two-tailed *P* value less than 0.05 was regarded as statistically significant. All the data are expressed as means±SE.

RESULTS

Effects of the treatments on general parameters

Basal cutaneous blood flow and systolic arterial blood pressure were not significantly changed by any treatment, which excludes direct vascular and haemodynamic effects of the drugs. Moreover, arterial blood pressure and cutaneous temperatures were stable throughout all protocols, showing hemodynamic and thermal stability.

Protocol 1: Nerve fiber involvement in cathodal CIV

Cutaneous blood flow in control rats increased in response to cathodal stimulation, differing significantly from that in EMLA-treated rats ($P<0.05$) (Fig. 1). Indeed, in control rats, cathodal stimulation increased cutaneous blood flow from 25 ± 3 a.u. at baseline to a maximum value of 41 ± 4 a.u. ($P<0.001$) at 4.5 min, representing cathodal CIV of $72\pm 11\%$. The response was totally abolished by nerve fiber inhibition using EMLA, without affecting basal blood flow (23 ± 2 a.u.).

Protocol 2: TRPV1 channel involvement in cathodal CIV

TRPV1 channel blockade with capsazepine strongly reduced cathodal CIV ($12\pm 2\%$) compared to that seen in DMSO control rats ($54\pm 6\%$, $P<0.001$) (Fig. 2), while basal blood flow was unchanged (36 ± 2 a.u. vs 32 ± 3 a.u.).

Protocol 3: ASIC channel involvement in cathodal CIV

ASIC channel blockade using amiloride strongly reduced cathodal CIV ($19\pm 8\%$) compared to that in saline control rats ($61\pm 6\%$, $P < 0.01$), whereas NHE1 inhibition using cariporide did not significantly affect CIV ($59\pm 10\%$) (Fig. 3). Basal blood flow was unchanged by injection of amiloride (31 ± 4 a.u.) or cariporide (42 ± 3 a.u.) compared to saline (37 ± 4 a.u.).

Protocol 4: CGRP receptor involvement in cathodal CIV

CGRP receptor blockade with CGRP8-37 strongly reduced cathodal CIV ($15\pm 6\%$) compared to that observed in saline control rats ($61\pm 6\%$, $P < 0.001$) (Fig. 4), while basal blood flow was unchanged (32 ± 4 a.u. vs 37 ± 4 a.u.).

Protocol 5: NK1 receptor involvement in cathodal CIV

NK1 blockade with SR140333 strongly reduced cathodal CIV ($9\pm 5\%$) compared to CIV in DMSO control rats ($54\pm 6\%$, $P < 0.001$) (Fig. 5), while basal blood flow was unchanged (38 ± 4 a.u. vs 32 ± 3 a.u.).

DISCUSSION

The present study in healthy rats shows that cutaneous TRPV1 and ASIC channels and cutaneous CGRP and NK1 receptors are involved in cathodal CIV. These findings support the scheme that cathodal CIV is induced by the vasodilator effects of CGRP and SP locally released following the excitation of capsaicin-sensitive fibers initiated by activation of cutaneous TRPV1 and ASIC channels in response to the cathodal current stimulation.

Up-stream mechanism involved in cathodal CIV: contribution of TRPV1 and ASIC channels

Inhibition of axon reflexes via the local application of the topical anesthetic EMLA cream, totally abolished cathodal CIV in healthy rats but did not affect basal skin blood flow. Others also found that blockade of nerve fibers by topical anesthesia significantly reduced axon reflex-mediated vasodilation without affecting basal cutaneous blood flow or endothelium-dependent vasodilation (Berghoff et al. 2002). The late plateau phase of the cutaneous vasodilator response to local skin warming was also unaffected by EMLA cream treatment (Cracowski et al. 2007). This observation indicates that vascular function was not affected by local anesthesia, since this plateau in vasodilation is mediated in large part by

nitric oxide release (Kellogg et al. 1999; Minson et al. 2001). Therefore the total abolition of cathodal CIV by local blockade of neural activity of the skin via application of EMLA cream indicates a requisite neural involvement, as previously reported in healthy humans (Durand et al. 2002a).

The mechanism by which cathodal current causes CIV is indicated by inhibition of TRPV1 and ASIC channels. More specifically, subcutaneous injection of capsazepine decreased cathodal CIV by 75%, demonstrating a major contribution by cutaneous TRPV1 channels. Indeed, capsazepine is a chemical analogue of capsaicin, which acts as a competitive antagonist for TRPV1 channels (Bevan et al. 1992; Szallasi et al. 1999). Accordingly, cathodal CIV was decreased by almost 55% following specific desensitization of capsaicin-sensitive fibers in the skin using chronic topical treatment with capsaicin in healthy volunteers (Durand et al. 2002a). Since TRPV1 channels are mostly located on capsaicin-sensitive sensory fibers in the skin, the present results support the idea that CIV resulted primarily from TRPV1 channel activation, leading to excitation of unmyelinated capsaicin-sensitive fibers. Amiloride also decreased cathodal CIV by about 70%, suggesting that amiloride-sensitive ASIC channels are also responsible for a substantial proportion of cathodal CIV, since the majority of ASIC channels expressed *in vitro* are inhibited by amiloride (Kellenberger et al. 2002; Ugawa et al. 2002; Waldmann et al. 1997b). In contrast to amiloride, the NHE inhibitor cariporide (Masereel et al. 2003) did not significantly affect CIV, ruling out an important involvement of NHE-1 in that response.

Taken together, our findings are consistent with the proposal that, at least in the healthy rat, the cathodal stimulation induces activation of TRPV1 and ASIC channels located on capsaicin-sensitive fibers in the skin that, in turn leads to cathodal CIV.

TRPV1 receptors are activated by noxious high temperatures ($>42^{\circ}\text{C}$), low (extracellular) or high (intracellular) pH, positive voltages and by pungent chemicals such as capsaicin, the active ingredient in hot chili peppers (Caterina et al. 1997; Dhaka et al. 2009; Tominaga et al. 1998; Voets et al. 2004). Regarding pH sensitivity, TRPV1 channels respond to either acidic or basic deviations from homeostatic pH (Dhaka et al. 2009). ASIC channels are also endogenous pH sensors expressed within sensory pathways, since they can be directly activated by protons in sensory neurons (Deval et al. 2010; Holzer 2009; Leffler et al. 2006). Local acidification of the skin following cathodal stimulation thus represents a plausible candidate for activation of TRPV1 and ASIC channels in cathodal CIV, although discrepancies exist. Indeed, in one study pH was unchanged in cathodal chamber fluid

following current application (Ferrell et al. 2002), whereas in another study the pH of cathodal water in contact with the skin increased to 10 during passage of current through the skin (Sato et al. 1993). In our experimental conditions, the pH of the skin surface decreased from 6.1 ± 0.1 to 5.7 ± 0.1 ($P < 0.01$) in response to cathodal stimulation, representing modest local acidification. Whether this local acidification measured at the surface of skin reflects a subcutaneous acidification remains to be determined. However one could assume that this local acidification of the skin surface could reflect dermal pH changes sufficient to activate TRPV1 and ASIC channels in response to cathodal stimulation.

Down-stream mechanism involved in cathodal CIV: contribution of CGRP and NK1 receptors

The subcutaneous injection of CGRP8-37 decreased cathodal CIV by 75%, demonstrating a major contribution of cutaneous CGRP receptors. Adrenomedullin receptors could also be involved, since adrenomedullin is co-localized with CGRP in sensory nerves and also can play a significant role in vascular biology (Brain et al. 2004). However, CGRP8-37 most probably inhibited cathodal CIV through inhibiting the action of released CGRP on cutaneous CGRP receptors, since it is firmly established that in the rat, as in other species, CGRP8–37 specifically blocks the vasodilation resulting from exogenously applied CGRP (Delay-Goyet et al. 1992; Habler et al. 1999; Taguchi et al. 1992). Furthermore, it has been shown that low pH evokes a sustained activation of C-fiber terminals (Steen et al. 1992), which causes a pronounced CGRP release in a rat skin–nerve preparation (Averbeck et al. 2001). This supports the idea that cathodal CIV relies partly on CGRP release consequent to the activation of capsaicin-sensitive fibers.

SR140333 also decreased cathodal CIV by 80%, demonstrating a major contribution of NK1 receptors. SP has the highest known affinity to the NK1 receptor and a very low affinity for other neurokinin receptors (Emonds-Alt et al. 1993; Quartara et al. 1997), including in the skin where human and murine keratinocytes express functional NK1 with high affinity for SP (Scholzen et al. 1998; Steinhoff et al. 2003). On that basis, we suggest from our findings that SP plays a major role in cathodal CIV. This suggestion is further supported by the ability of SR 140333 to antagonize the vasodilation induced by application of exogenous SP in rat hairy and glabrous skin (Habler et al. 1999). Moreover, as for CGRP, TRPV1 channel activation provokes depolarization of sensory nerves and release of SP (Holzer 1991). In human and rat skin, efferent neurosecretory responses to noxious stimuli,

including intense electrical stimulation, involve the release of CGRP and SP (Sauerstein et al. 2000b; Schmelz et al. 2001). Accordingly, a synergism between CGRP and SP was reported in human (Brain et al. 1988) and rat (Gamse et al. 1985) skin. More generally, it is generally felt that CGRP and SP are co-released from cutaneous sensory terminals and are the neuropeptides ultimately responsible for axon reflex-mediated vasodilation (Schmelz et al. 1997; Wallengren et al. 1987). Therefore, as expected, our findings indicate, that in healthy rat skin, both CGRP and SP participate in cathodal CIV, likely through the production of prostacyclin via the COX-1 pathway (Gohin et al. 2011).

Each antagonist when given individually equally reduced cathodal CIV (about 70-80%). This could suggest that CIV relies on a mechanism in series, such that each element of the set is essential to the function. It could also imply some commonality within the drugs. Indeed both capsazepine and amiloride could block impulse conduction in sensory nerves (Hayes et al. 2007), thereby attenuating CGRP and substance P release (Franco-Cereceda et al. 1993; Santicioli et al. 1993; Zhong et al. 2007a). Moreover capsazepine, CGRP8-37 and the NK1 antagonist L703,606 could reduce prostacyclin production (Gallicchio et al. 2006; Harada et al. 2003; Mizutani et al. 2009) and we recently demonstrated that prostacyclin plays a major role in cathodal CIV (Gohin et al. 2011). Although each drug is selective for a channel or receptor, it may not be specific in its action, given a plausible explanation for the large decrease in cathodal CIV observed for individual blockade. Based on these overall findings, one might speculate that cathodal CIV results from a cascade of events where cathodal stimulation activates capsaicin-sensitive sensory fibers via TRPV1 and ASIC channels, which leads to CGRP and SP release and a subsequent production of endogenous prostacyclin to relax cutaneous microvessels.

Conclusion

To our knowledge, this study conducted in healthy rats is the first integrative study to show that cutaneous vasodilation in response to cathodal stimulation involves cutaneous TRPV1 and ASIC channels. The involvement of CGRP and NK1 receptors suggests that cathodal CIV is the result of CGRP and SP released by activated capsaicin-sensitive fibers. Therefore cathodal CIV could be a valuable non-invasive method to assess sensory neurovascular function in the skin, which could be particularly relevant in evaluating the presence of small nerve fiber disorders and the efficacy of treatment for such disorders.

Acknowledgements

The authors want to thank Dr Emonds-Alt from SANOFI (France) for the gracious gift of the NK1 receptor antagonist (SR140333). The authors gratefully acknowledge Audrey Josset-Lamaugarny for her technical support.

Disclosures

None of the authors have a conflict of interest.

References

1. **Averbeck B and Reeh PW.** Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E(2) from isolated rat skin. *Neuropharmacology* 40: 416-423, 2001.
2. **Aye NN, Xue YX, and Hashimoto K.** Antiarrhythmic effects of cariporide, a novel Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on reperfusion ventricular arrhythmias in rat hearts. *Eur J Pharmacol* 339: 121-127, 1997.
3. **Berghoff M, Kathpal M, Kilo S, Hilz MJ, and Freeman R.** Vascular and neural mechanisms of ACh-mediated vasodilation in the forearm cutaneous microcirculation. *J Appl Physiol* 92: 780-788, 2002.
4. **Berliner MN.** Skin microcirculation during tapwater iontophoresis in humans: cathode stimulates more than anode. *Microvasc Res* 54: 74-80, 1997.
5. **Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, and Yeats JC.** Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107: 544-552, 1992.
6. **Bjerring P, Andersen PH, and Arendt-Nielsen L.** Vascular response of human skin after analgesia with EMLA cream. *Br J Anaesth* 63: 655-660, 1989.
7. **Brain SD and Grant AD.** Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 84: 903-934, 2004.
8. **Brain SD and Williams TJ.** Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Nature* 335: 73-75, 1988.
9. **Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D.** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824, 1997.
10. **Cracowski JL, Lorenzo S, and Minson CT.** Effects of local anaesthesia on subdermal needle insertion pain and subsequent tests of microvascular function in human. *Eur J Pharmacol* 559: 150-154, 2007.
11. **Delay-Goyet P, Satoh H, and Lundberg JM.** Relative involvement of substance P and CGRP mechanisms in antidromic vasodilation in the rat skin. *Acta Physiol Scand* 146: 537-538, 1992.
12. **Deval E, Gasull X, Noel J, Salinas M, Baron A, Diochot S, and Lingueglia E.** Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 128: 549-558, 2010.
13. **Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M, and Patapoutian A.** TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* 29: 153-158, 2009.
14. **Durand S, Fromy B, Bouye P, Saumet JL, and Abraham P.** Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0.10 mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms. *J Vasc Res* 39: 59-71, 2002.
15. **Durand S, Fromy B, Bouye P, Saumet JL, and Abraham P.** Vasodilatation in response to repeated anodal current application in the human skin relies on aspirin-sensitive mechanisms. *J Physiol* 540: 261-269, 2002.
16. **Emonds-Alt X, Doutremepuich JD, Heulme M, Neliat G, Santucci V, Steinberg R, Vilain P, Bichon D, Ducoux JP, Proietto V, and et al.** In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 250: 403-413, 1993.
17. **Ferrell WR, Ramsay JE, Brooks N, Lockhart JC, Dickson S, McNeece GM, Greer IA, and Sattar N.** Elimination of electrically induced iontophoretic artefacts: implications for non-invasive assessment of peripheral microvascular function. *J Vasc Res* 39: 447-455, 2002.

18. **Franco-Cereceda A, Kallner G, and Lundberg JM.** Capsazepine-sensitive release of calcitonin gene-related peptide from C-fibre afferents in the guinea-pig heart by low pH and lactic acid. *Eur J Pharmacol* 238: 311-316, 1993.
19. **Fromy B, Merzeau S, Abraham P, and Saumet JL.** Mechanisms of the cutaneous vasodilator response to local external pressure application in rats: involvement of CGRP, neurokinins, prostaglandins and NO. *Br J Pharmacol* 131: 1161-1171, 2000.
20. **Gallicchio M, Rosa AC, Benetti E, Collino M, Dianzani C, and Fantozzi R.** Substance P-induced cyclooxygenase-2 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 147: 681-689, 2006.
21. **Gamse R and Saria A.** Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol* 114: 61-66, 1985.
22. **Gibbins IL, Furness JB, Costa M, MacIntyre I, Hillyard CJ, and Girgis S.** Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci Lett* 57: 125-130, 1985.
23. **Gohin S, Sigaudou-Roussel D, Conjard-Duplany A, Dubourg L, Saumet JL, and Fromy B.** What can current stimulation tell us about the vascular function of endogenous prostacyclin in healthy rat skin in vivo? *J Invest Dermatol* 131: 237-244, 2011.
24. **Grossmann M, Jamieson MJ, Kellogg DL, Jr., Kosiba WA, Pergola PE, Crandall CG, and Shepherd AM.** The effect of iontophoresis on the cutaneous vasculature: evidence for current-induced hyperemia. *Microvasc Res* 50: 444-452, 1995.
25. **Habler HJ, Timmermann L, Stegmann JU, and Janig W.** Involvement of neurokinins in antidromic vasodilatation in hairy and hairless skin of the rat hindlimb. *Neuroscience* 89: 1259-1268, 1999.
26. **Hamdy O, Abou-Elenin K, LoGerfo FW, Horton ES, and Veves A.** Contribution of nerve-axon reflex-related vasodilation to the total skin vasodilation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care* 24: 344-349, 2001.
27. **Harada N, Okajima K, Uchiba M, and Katsuragi T.** Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G1214-1224, 2003.
28. **Hayes SG, Kindig AE, and Kaufman MP.** Blockade of acid sensing ion channels attenuates the exercise pressor reflex in cats. *J Physiol* 581: 1271-1282, 2007.
29. **Holzer P.** Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol* 194: 283-332, 2009.
30. **Holzer P.** Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43: 143-201, 1991.
31. **Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, and Denda M.** Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 124-129, 2002.
32. **Jiang N, Rau KK, Johnson RD, and Cooper BY.** Proton sensitivity Ca²⁺ permeability and molecular basis of acid-sensing ion channels expressed in glabrous and hairy skin afferents. *J Neurophysiol* 95: 2466-2478, 2006.
33. **Kellenberger S and Schild L.** Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 82: 735-767, 2002.
34. **Kellogg DL, Jr., Liu Y, Kosiba IF, and O'Donnell D.** Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J Appl Physiol* 86: 1185-1190, 1999.

35. **Kilo S, Harding-Rose C, Hargreaves KM, and Flores CM.** Peripheral CGRP release as a marker for neurogenic inflammation: a model system for the study of neuropeptide secretion in rat paw skin. *Pain* 73: 201-207, 1997.
36. **Kress M, Guthmann C, Averbeck B, and Reeh PW.** Calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience* 89: 303-310, 1999.
37. **Leffler A, Monter B, and Koltzenburg M.** The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience* 139: 699-709, 2006.
38. **Masereel B, Pochet L, and Laeckmann D.** An overview of inhibitors of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *Eur J Med Chem* 38: 547-554, 2003.
39. **Minson CT, Berry LT, and Joyner MJ.** Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol* 91: 1619-1626, 2001.
40. **Mizutani A, Okajima K, Murakami K, Mizutani S, Kudo K, Uchino T, Kadoi Y, and Noguchi T.** Activation of sensory neurons reduces ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats. *Anesthesiology* 110: 361-369, 2009.
41. **Quartara L and Maggi CA.** The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* 31: 537-563, 1997.
42. **Santicioli P, Del Bianco E, Figini M, Bevan S, and Maggi CA.** Effect of capsazepine on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity (CGRP-LI) induced by low pH, capsaicin and potassium in rat soleus muscle. *Br J Pharmacol* 110: 609-612, 1993.
43. **Sato K, Timm DE, Sato F, Templeton EA, Meletiou DS, Toyomoto T, Soos G, and Sato SK.** Generation and transit pathway of H⁺ is critical for inhibition of palmar sweating by iontophoresis in water. *J Appl Physiol* 75: 2258-2264, 1993.
44. **Sauerstein K, Klede M, Hilliges M, and Schmelz M.** Electrically evoked neuropeptide release and neurogenic inflammation differ between rat and human skin. *J Physiol* 529: 803-810, 2000.
45. **Schmelz M, Luz O, Averbeck B, and Bickel A.** Plasma extravasation and neuropeptide release in human skin as measured by intradermal microdialysis. *Neurosci Lett* 230: 117-120, 1997.
46. **Schmelz M and Petersen LJ.** Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci* 16: 33-37, 2001.
47. **Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, and Ansel JC.** Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 7: 81-96, 1998.
48. **Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, and Travers JB.** Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 217-222, 2003.
49. **Steen KH, Reeh PW, Anton F, and Handwerker HO.** Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci* 12: 86-95, 1992.
50. **Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, and Luger T.** Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol* 139: 1479-1488, 2003.
51. **Szallasi A and Blumberg PM.** Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51: 159-212, 1999.
52. **Szolcsanyi J.** Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 38: 377-384, 2004.

53. **Taguchi T, Kawasaki H, Imamura T, and Takasaki K.** Endogenous calcitonin gene-related peptide mediates nonadrenergic noncholinergic depressor response to spinal cord stimulation in the pithed rat. *Circ Res* 71: 357-364, 1992.
54. **Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, and Julius D.** The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543, 1998.
55. **Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, and Shimada S.** Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 110: 1185-1190, 2002.
56. **Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, and Nilius B.** The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430: 748-754, 2004.
57. **Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, and Lazdunski M.** A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386: 173-177, 1997.
58. **Wallengren J and Hakanson R.** Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. *Eur J Pharmacol* 143: 267-273, 1987.
59. **Wang Y, Novotny M, Quaiserova-Mocko V, Swain GM, and Wang DH.** TRPV1-mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1517-1523, 2008.
60. **Westerman RA, Widdop RE, Hogan C, and Zimmet P.** Non-invasive tests of neurovascular function: reduced responses in diabetes mellitus. *Neurosci Lett* 81: 177-182, 1987.
61. **White DJ, Maass DL, Sanders B, and Horton JW.** Cardiomyocyte intracellular calcium and cardiac dysfunction after burn trauma. *Crit Care Med* 30: 14-22, 2002.
62. **Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Nagao M, and Shimada S.** Epithelial Na⁺ channel delta subunit mediates acid-induced ATP release in the human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 155-158, 2008.
63. **Zhong B and Wang DH.** TRPV1 gene knockout impairs preconditioning protection against myocardial injury in isolated perfused hearts in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1791-1798, 2007.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Time-dependent changes in cutaneous blood flow in response to cathodal stimulation in control rats and in rats treated with a local application of topical anaesthetic (EMLA). Values are means \pm SE of n = 10 rats/group. * $P < 0.05$ compared to control rats.

Fig. 2. Percent increase in cutaneous blood flow over the baseline in response to cathodal stimulation in control rats (DMSO, s.c.) and in rats treated with capsaizepine (CPZ, 3 mg/kg, s.c.). Values are means \pm SE of n = 10 rats/group. *** $P < 0.001$ compared to control rats.

Fig. 3. Percent increase in cutaneous blood flow over the baseline in response to cathodal stimulation in control rats (saline, s.c.) and in rats treated with amiloride (50 mg/kg, s.c.) and cariporide (0.2 mg/kg, s.c.). Values are means \pm SE of n = 10 rats/group. ** $P < 0.01$ compared to control rats.

Fig. 4. Percent increase in cutaneous blood flow over the baseline in response to cathodal stimulation in control rats (saline, s.c.) and in rats treated with CGRP₈₋₃₇ (0.1 mg/kg, s.c.). Values are means \pm SE of n = 10 rats/group. *** $P < 0.001$ compared to control rats.

Fig. 5. Percent increase in cutaneous blood flow over the baseline in response to cathodal stimulation in control rats (DMSO, s.c.) and in rats treated with SR140333 (0.2 mg/kg, s.c.). Values are means \pm SE of n = 10 rats/group. *** $P < 0.001$ compared to control rats.

Fig. 1. Nerve fiber involvement in cathodal CIV.

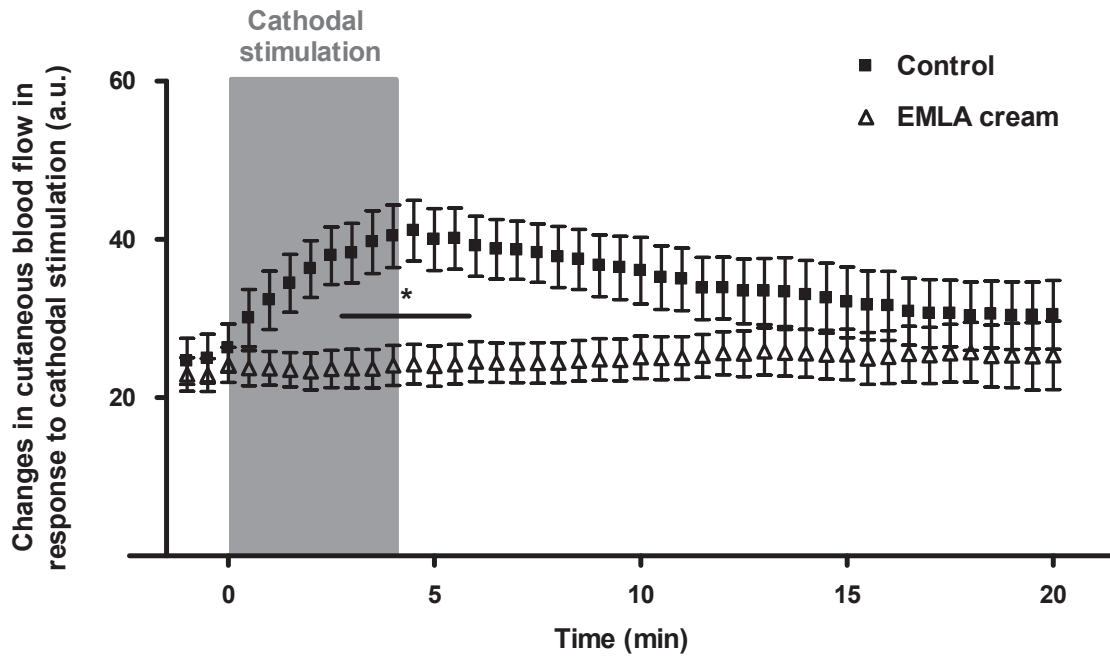


Fig. 2. TRPV1 channel involvement in cathodal CIV.

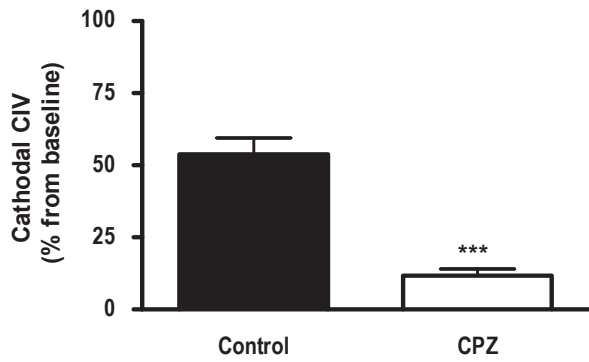


Fig. 3. ASIC channel involvement in cathodal CIV.

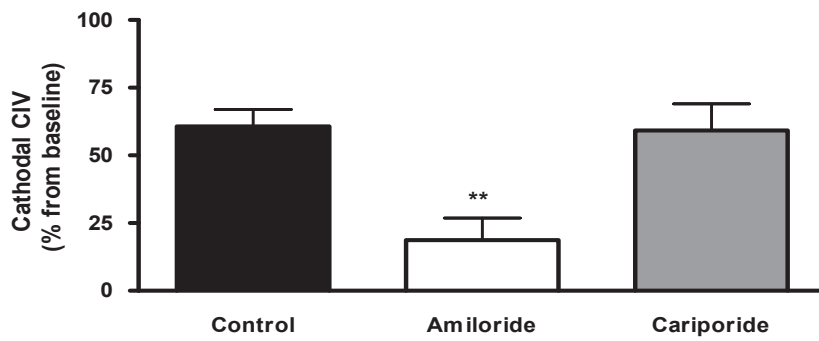


Fig. 4. CGRP receptor involvement in cathodal CIV.

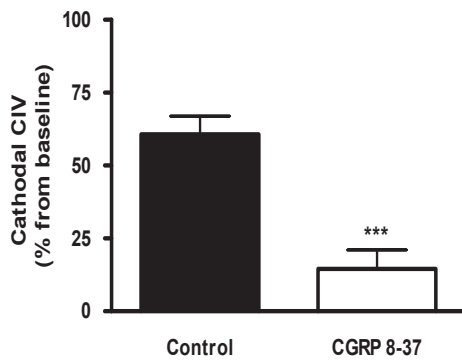
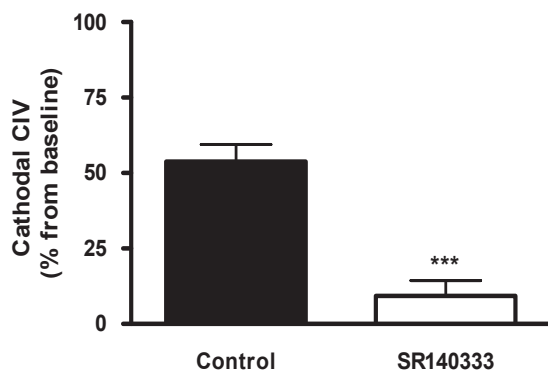


Fig. 5. NK1 receptor involvement in cathodal CIV.



La vasodilatation induite par le courant et l'implication des TRPV1 et CGRP spinaux

Introduction

La vasodilatation cutanée induite par le courant (CIV) en réponse à l'application d'un courant galvanique est un mécanisme neurovasculaire proposé comme étant de type « axone réflexe ». En effet, plusieurs observations supportent cette idée: implication des fibres capsaïcino-sensibles, rôle de nocicepteurs TRPV1 et ASIC cutanés, implication des neuropeptides CGRP et substance P, forte implication des COX). De plus, un mécanisme « axone réflexe » signifie que les fibres nerveuses activées par un stimulus sont capables de répondre directement sans passer par le SNC. Ces mécanismes sont locaux, ainsi une fibre activée va transmettre l'activation aux fibres nerveuses voisines et permettre conjointement la libération des neuromédiateurs responsables de la réponse comme une vasodilatation. Ce mécanisme a été décrit comme étant extrêmement localisé mais de plus en plus d'études récentes démontrent qu'une partie de l'activation va remonter le long des fibres jusqu'à la moelle épinière. Ainsi dans le cas des lésions de la moelle épinière, ces réponses « axone réflexe » ne sont certes pas abolies mais réduites démontrant une participation modérée de la moelle épinière (Kuesgen et al. 2002; Schmelz et al. 2000).

De plus en plus d'études démontrent que certains récepteurs et canaux spinaux comme les TRPV1 et le CGRP sont indispensables dans les mécanismes cutanés de type « axone réflexe » (Kanai et al. 2006; Sun et al. 2004a).

Si la CIV est un mécanisme axone réflexe, la voie spinale et en particulier les TRPV1 et le CGRP spinaux peuvent être impliqués.

But de l'étude

Déterminer si la CIV cathodale est partiellement contrôlée par une transduction spinale avec la participation des canaux TRPV1 et les récepteurs du CGRP spinaux.

Matériels et Méthodes spécifiques pour cette étude

Cette étude a été réalisée chez des rats Wistar mâles (200-400g) sains. Les rats ont été traités avec de la bupivacaïne (1%, i.t., n=10), de la capsazépine (20µg, i.t., n=10), du CGRP8-37 (10nmol, i.t., n=10). Pour évaluer la CIV cathodale, nous avons mesuré le flux sanguin cutané par laser Doppler pendant 20 minutes en réponse à l'application du courant cathodale (240s ; 0.1mA) sur les cuisses des rats sains anesthésiés (thiopental, 50mg/kg, i.p.).

Résultats

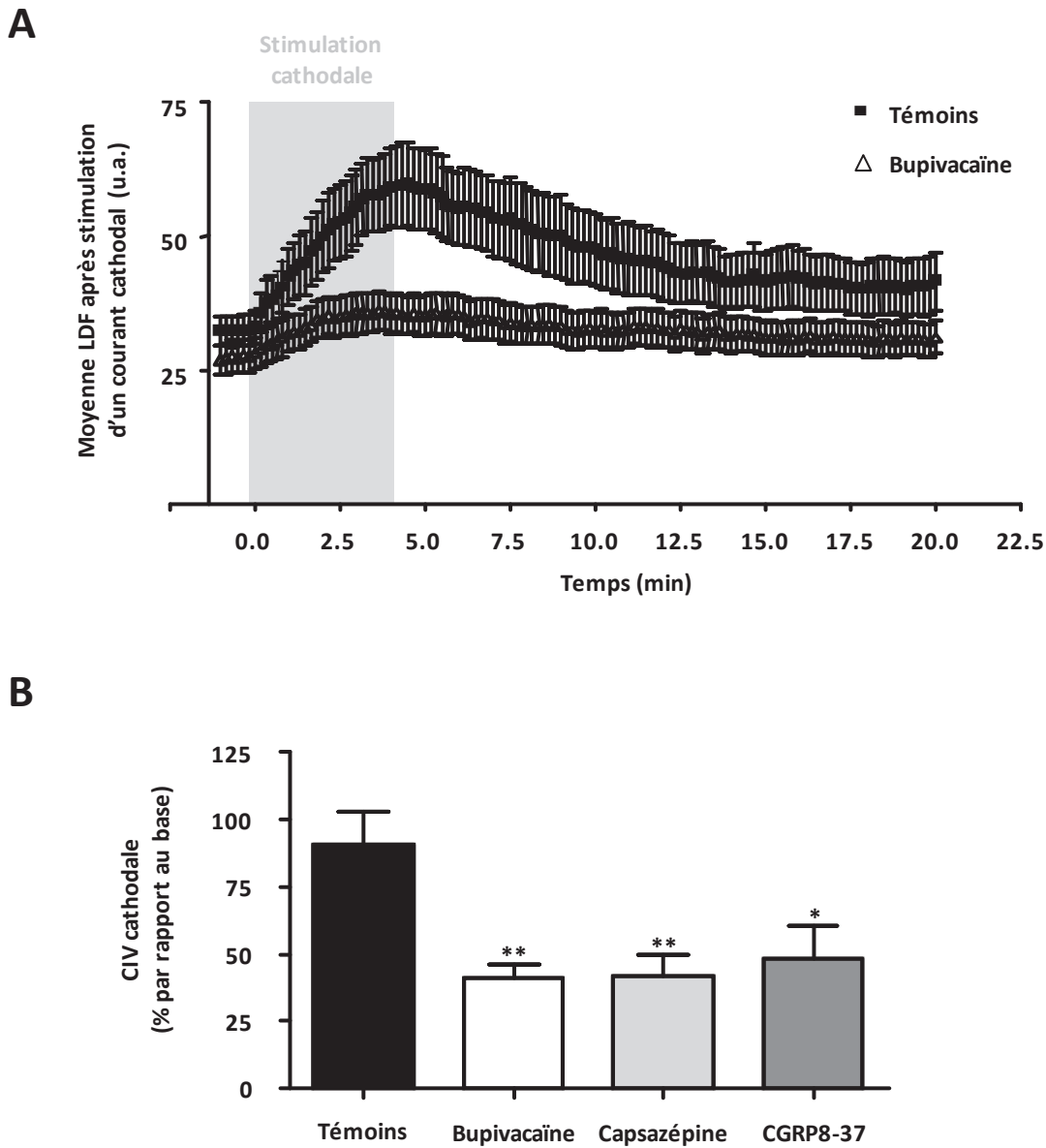


Figure 28. (A) Evolution temporelle du flux sanguin cutané en réponse à l'application d'un courant cathodal (240s ; 100 μ A) sur la cuisse chez les rats témoins (sérum physiologique, i.t, n=10) et chez des rats traités avec un anesthésique locale (bupivacaïne, 1%, i.t., n=10), un inhibiteur spécifique des TRPV1 (capsazépine, 20 μ g, i.t., n=10) et un inhibiteur spécifique des récepteurs CGRP (CGRP8-37, 10 nmol, i.t., n=10).

(B) Histogramme représentant la moyenne \pm SEM de l'amplitude maximale de la CIV en réponse à l'application d'un courant cathodal (240s ; 100 μ A) sur la cuisse chez les rats témoins (sérum physiologique, i.t, n=10) et chez des rats traités avec un anesthésique locale

(bupivacaïne, 1%, i.t., n=10), un inhibiteur spécifique des TRPV1 (capsazépine, 20 µg, i.t., n=10) et un inhibiteur spécifique des récepteurs CGRP (CGRP8-37, 10 nmol, i.t., n=10).

**P<0.01 vs témoins, *P<0.05 vs témoins. One-Way ANOVA avec post test Dunnett.

Chez les rats témoins, le courant cathodal a augmenté le flux sanguin cutané moyen de 32 ± 3 u.a au repos à une valeur maximale de 62 ± 8 u.a ($P<0.001$), représentant une CIV cathodale de $91\pm 13\%$.

Chez des rats traités à la bupivacaïne, le courant cathodal a augmenté le flux sanguin cutané de 27 ± 3 u.a au repos à une valeur maximale de 38 ± 4 u.a ($P<0.001$), représentant une CIV cathodale de $41\pm 5\%$.

Chez des rats traités à la capsazépine, le courant cathodal a augmenté le flux sanguin de 31 ± 3 u.a au repos à une valeur maximale de 44 ± 5 u.a ($P<0.001$), représentant une CIV cathodale de $42\pm 7\%$.

Chez des rats traités au CGRP8-37, le courant cathodal a augmenté le flux sanguin de 29 ± 3 u.a au repos à une valeur maximale de 45 ± 7 u.a ($P<0.001$), représentant une CIV cathodale de $49\pm 12\%$.

La bupivacaïne, la capsazépine et le CGRP8-37 injectés directement au niveau de la moelle épinière ont donc réduit respectivement la CIV de 55%, 54% et de 46% (Figures 28 A et B).

Discussion

La CIV est réduite suite aux injections intrathécales de bupivacaïne, de capsazépine et de CGRP8-37. Nos résultats démontrent que la CIV cathodale est en partie sous contrôle spinal sensorielle avec la participation des récepteurs TRPV1 et CGRP spinaux.

Les canaux/récepteurs TRPV1 et CGRP sont retrouvés au niveau de la corne dorsale superficielle de la moelle épinière (Spicarova et al. 2008) mais surtout au niveau des neurones sensoriels des DRG (Caterina et al. 1997; Szallasi et al. 1999). De plus, l'expression des TRPV1 dans les DRG est située au niveau des axones des fibres C et A δ (Valtschanoff et al. 2001).

Le rôle du CGRP au niveau spinal est décrit comme sensibilisateur des neurones de la moelle épinière suite à une injection intradermique de capsaïcine chez le rat (Sun et al. 2004a).

L'implication des canaux/récepteurs spinaux TRPV1 et CGRP dans la CIV cathodale est en parfait accord avec l'implication des fibres capsaïcino-sensibles.

De plus en plus d'études démontrent la participation d'une voie spinale dans une réponse axone réflexe. Ainsi, l'injection de formaline (produit chimique) est capable d'induire une réponse axone réflexe (léchage des animaux), inhibée par la capsazépine injectée en intrathécale démontrant la participation des TRPV1 spinaux (Kanai et al. 2006). De la même manière, une injection de capsaïcine sous la patte induit une vasodilatation de type axone réflexe et un œdème. Ces réponses cutanées sont réduites après une rhizotomie dorsale (destruction des racines nerveuses rattachées à la moelle épinière), montrant la participation partielle de la voie spinale (Lin et al. 2007). Chez le rat, une ligature des nerfs spinaux ou chez l'homme, une lésion de la moelle épinière conduisent également à l'atténuation de la réponse axone réflexe (Kauppila et al. 2002; Kuesgen et al. 2002). Comme ces mécanismes axones réflexes, la CIV cathodale est partiellement dépendante d'un contrôle spinal sensoriel.

Conclusion

La CIV cathodale chez le rat sain est un mécanisme cutané de type axone réflexe reposant en partie sur l'intégrité de la voie sensorielle spinale avec en particulier la participation des TRPV1 et du CGRP spinaux.

Perspective

Pour comprendre le mécanisme au niveau spinal, des études ont montré que l'injection de capsaïcine (stimulateur exogène des TRPV1), directement sur des coupes de moelles épinières isolées, était responsable d'une dépolarisation (Dickenson et al. 1991; Yang et al. 1998a) et d'une augmentation du relargage de la SP et du CGRP (Saria et al. 1986) ainsi que du relargage du glutamate (Kangrga et al. 1990; Tohda et al. 1996). De plus, les fibres nerveuses possédant des TRPV1 sont dites « glutamatergiques ». Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le glutamate spinal pourrait être impliqué en partie dans le développement spinal de la CIV.

La vasodilatation induite par le courant et l'inflammation neurogénique

Introduction

Les mécanismes axones réflexes conduisent souvent à une inflammation neurogénique décrite comme une réaction neurochimique qui se produit lors de la stimulation modérée à intense d'un nerf sensitif. Une fois activés, ces nerfs vont libérer de la substance P et du CGRP au niveau du site stimulé et peuvent se propager progressivement vers tous les tissus sains adjacents selon l'intensité de la stimulation. L'inflammation neurogénique est donc capable d'induire une vasodilatation, une extravasation plasmatique ou wheal (papule œdémateuse), attraction de cellules inflammatoires leucocytaires et un flare c'est-à-dire la propagation de la vasodilatation autour du site activé grâce à la libération de nombreux médiateurs. Il est intéressant de noter que la découverte de l'inflammation neurogénique tire son origine de la stimulation électrique des nerfs sciatiques à 50V (White et al. 1985).

Induite par une stimulation électrique, la CIV (mécanisme de type axone réflexe) est-elle accompagnée par une réponse inflammatoire avec une propagation de vasodilatation autour de la zone stimulée ?

But de l'étude

Déterminer si la stimulation électrique utilisée pour induire une CIV cathodale induit une inflammation neurogénique (présence d'un flare à distance de la stimulation initiale et présence de cellules inflammatoires leucocytaires au niveau du site de stimulation électrique).

Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée chez des rats Wistar mâles (200-400g) sains. Pour évaluer si une réaction de propagation de la vasodilatation (flare) accompagne la CIV, nous avons mesuré simultanément le flux sanguin cutané au point de stimulation (CIV cathodale) et le flux sanguin cutané à distance (20mm) de la stimulation cathodale (240s ;0.1mA) sur les cuisses des rats sains anesthésiés (Figure 29).

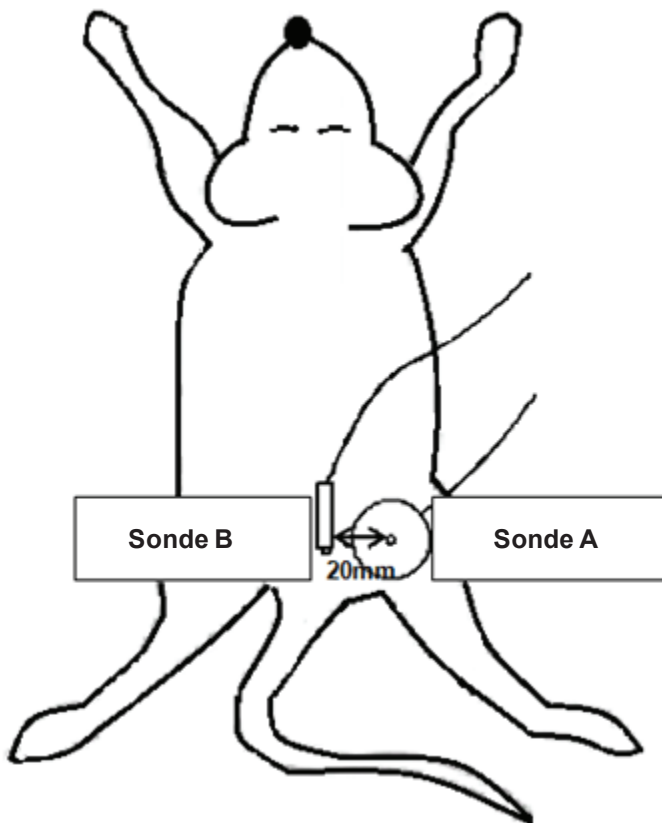


Figure 29. Représentation schématique de l'installation du rat permettant d'étudier simultanément le flux sanguin cutané sous la sonde de iontophorèse où la stimulation électrique est réalisée (sonde A) et à 20 mm de distance de la stimulation électrique (sonde B).

Pour vérifier si l'infiltration leucocytaire apparaît sur le site d'application du courant cathodal (240s ; 0.1mA), nous avons prélevé des biopsies de peau au site de stimulation, 24h après avoir appliqué le courant afin de réaliser des coupes histologiques.

Résultats

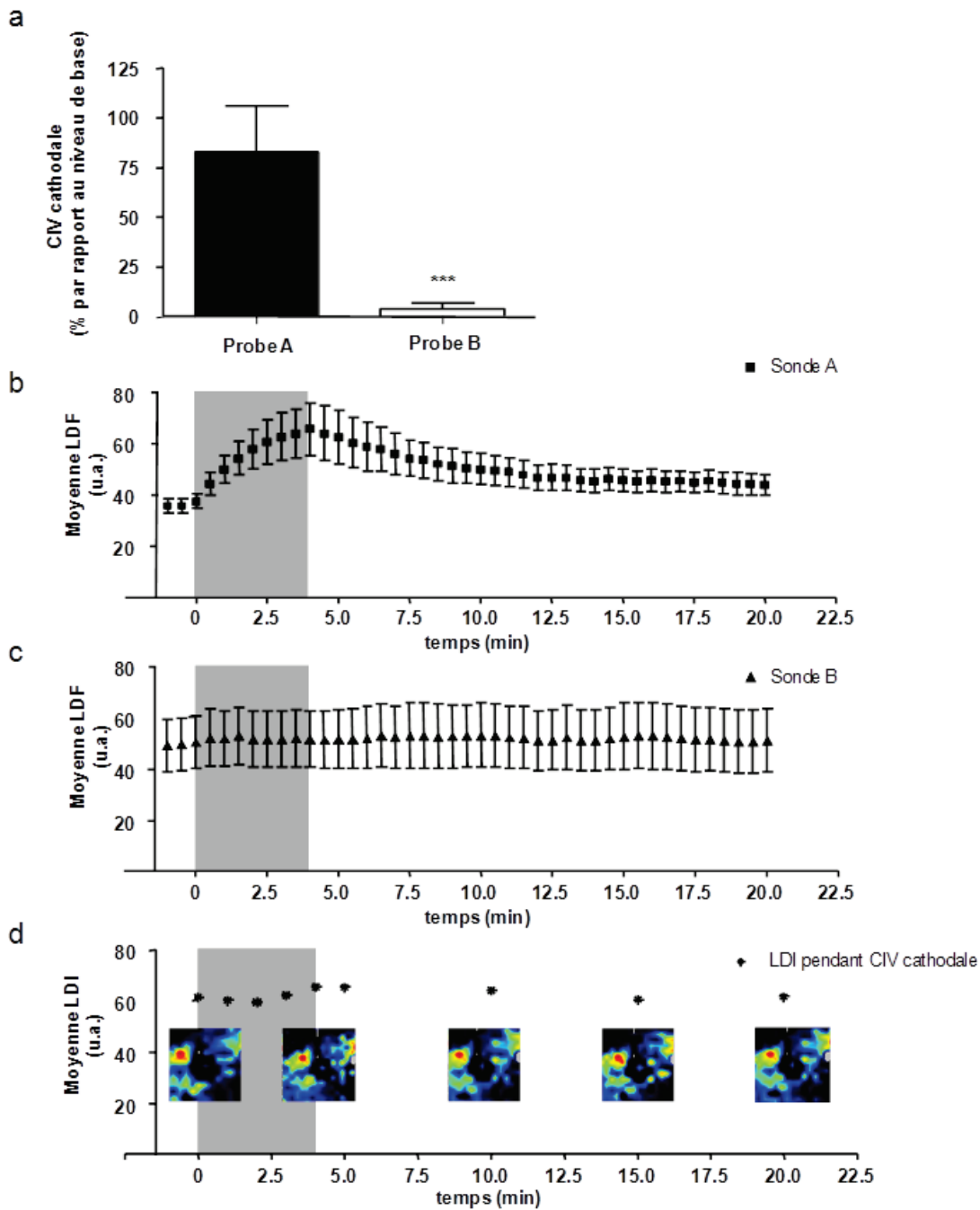


Figure 30. La propagation de la vasodilatation induite par le courant

(a) Histogramme représentant la moyenne \pm SEM de l'amplitude maximale de la CIV en réponse à l'application d'un courant cathodale de 240s à 100 μ A chez les rats anesthésiés sous la stimulation électrique (sonde A, n=10) et sous la sonde à 20mm de distance (sonde B, n=10).

***P<0.001 vs sonde A (t-test non apparié)

(b) Evolution temporelle du flux sanguin cutané en réponse à l'application d'un courant cathodale (200s ; 100 μ A) (sonde A).

(c) Evolution temporelle du flux sanguin cutané à 20mm de distance de la réponse à l'application d'un courant cathodale (200s ; 100 μ A) (sonde B).

(d) Evolution temporelle du flux sanguin cutané mesuré par le laser imageur PIM3 avec les images correspondantes.

Au point de stimulation (sonde A), l'application d'un courant cathodal a augmenté le flux sanguin cutané de 36 ± 3 u.a au repos à une valeur maximale de 66 ± 10 u.a., représentant une CIV de $83\pm 23\%$ ($P < 0.001$) (Figure 30). A l'inverse, le courant cathodal n'a pas modifié le flux sanguin cutané à distance de la stimulation (sonde B), indiquant l'absence de flare à distance du site de stimulation ($P < 0.001$) (Figure 30 a, b et c), corrélée avec les résultats du laser imageur (Figure 30 d).

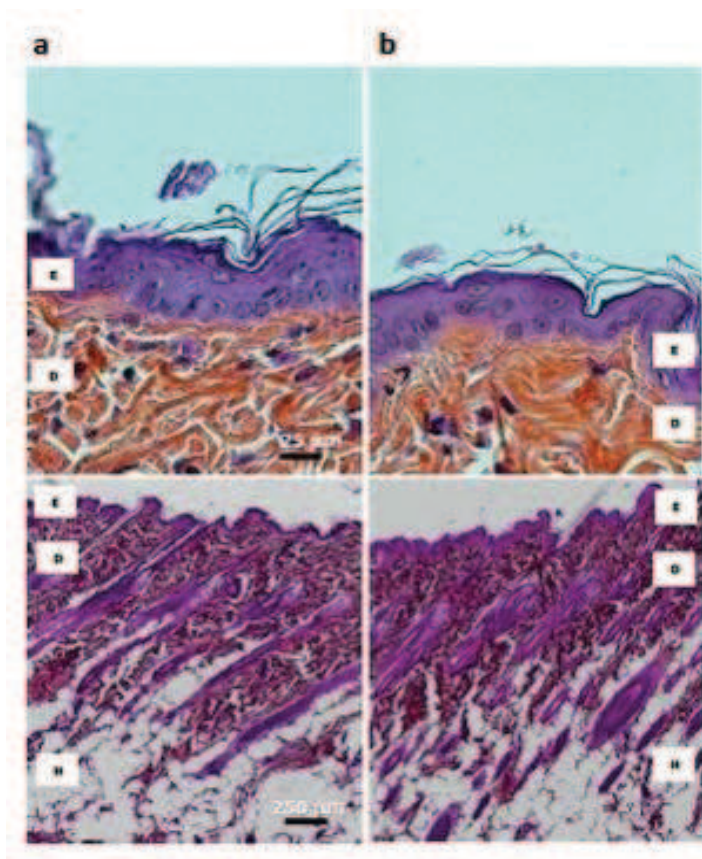


Figure 31. Coupes histologiques de peau avant (a) et 24 heures après l'application d'une stimulation électrique cathodale (240s, 100 μ A) (b) chez un rat sain.

E : épiderme, D : derme, H : hypoderme.

Nous avons caractérisé la structure d'une peau saine avant (a) et d'une peau après l'application d'une stimulation électrique cathodale (b) par l'examen histologique cutané. Aucune différence significative dans l'épaisseur de l'épiderme et du derme, ni aucune modification structurale n'a été observée entre une peau stimulée et une peau non stimulée. De plus, nous n'avons vu ni infiltration leucocytaire ni œdème 24 h après la stimulation électrique (figure 31).

Discussion

Bien que les études effectuées chez l'homme et le rat supportent l'idée que la CIV est un mécanisme « axone réflexe », nos résultats démontrent que la CIV n'est pas associée avec un flare ou une inflammation : en effet, la stimulation cathodale n'a pas entraîné de vasodilatation caractéristique du flare (20mm autour de la vasodilatation primaire) ou d'inflammation neurogénique (pas de cellules inflammatoires, ni d'œdème au site de l'application du courant).

Dans nos études, nous utilisons une intensité beaucoup plus faible (0.1mA) qui n'a pas engendré un flare. Jusqu'à 2.5mA, toute stimulation électrique n'induisait pas non plus de flare chez l'homme et le cochon (Dusch et al. 2009). En revanche, de fortes intensités (80mA) peuvent induire une inflammation neurogénique (Sauerstein et al. 2000a).

De plus, il est rapporté que plus l'intensité est élevée, plus le nombre de fibres sensorielles activées est important, provoquant alors une extravasation plasmatique caractéristique d'une inflammation neurogénique. Ainsi la taille du flare est corrélée avec la densité de nerfs sensoriels épidermiques activés et présents dans la peau (Bickel et al. 2009). Nous émettons l'hypothèse que dans nos conditions expérimentales la stimulation électrique suffisante pour induire la CIV active un nombre trop limité de fibres sensorielles pour permettre le développement d'un flare.

Conclusion

La CIV est un mécanisme neurovasculaire physiologique de type axone réflexe n'induisant pas d'inflammation du fait de sa faible intensité (100µA). La CIV est donc une technique intéressante pour étudier les interactions neurovasculaires dans la microcirculation cutanée sans réaction inflammatoire.

CHAPITRE 4 :

Le chapitre 4 est divisé en trois grandes parties avec en première partie, une discussion générale qui résume les conclusions tirées de l'ensemble des études réalisées avec des schémas bilans. La deuxième partie permet de faire une synthèse afin de mettre en évidence les similitudes et les différences entre ces deux réponses neurovasculaires. La troisième partie intitulée « perspectives » ouvre quelques pistes pour de futurs travaux.

Discussion générale

1) La PIV en conditions physiologiques

L'application d'une pression locale non nociceptive provoque l'augmentation du flux sanguin cutané (PIV) en conditions physiologiques. Décrite comme un mécanisme physiologique neurovasculaire, la PIV permet de retarder l'ischémie cutanée engendrée par des pressions importantes pouvant jouer un rôle protecteur vis-à-vis des lésions ischémiques de pression. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu, des études ont été menées depuis sa découverte en 1998 permettant de proposer un schéma mécanistique. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans la PIV en conditions physiologiques en périphérie (Figure 30) et au niveau spinal (Figure 31).

Implication des COX-1 :

L'implication des cyclooxygénases (COX) avait été mise en évidence grâce à l'injection intrapéritonéale d'indométacine (inhibiteur non spécifique des COX) qui entraînait une diminution de la PIV chez le rat sain.

En utilisant des inhibiteurs spécifiques, nous avons mis en évidence l'implication des COX-1 (et non celle des COX-2) dans le développement de la PIV chez le rat sain. D'après la cascade classiquement décrite dans la littérature, nous émettons l'hypothèse que la PIV repose en partie sur la libération de prostacycline (principal vasodilatateur dans la microcirculation cutanée en conditions physiologiques) suivant la voie COX-1/PGIS/PGI2/IP. Cette voie vient

en parallèle de la voie vasodilatatrice du monoxyde d'azote (NO) qui joue un rôle prépondérant dans la PIV en conditions physiologiques (Fromy et al. 2000).

Implication des récepteurs TRPV1 cutanés :

L'implication des fibres capsaïcino-sensibles avait été mise en évidence par l'application chronique de capsaïcine chez l'homme et un traitement néonatal de capsaïcine chez le rat (Fromy et al. 1998; Fromy et al. 2000). Ceci suggérant fortement la participation des TRPV1 cutanés présents sur les fibres capsaïcino-sensibles.

En utilisant l'inhibiteur spécifique du récepteur à la capsaïcine (capsazépine), nous avons montré l'implication des récepteurs TRPV1 cutanés dans la PIV. Cependant, la relation entre la pression appliquée sur la peau et l'activation de TRPV1 reste encore inconnue. Ces nouveaux éléments cutanés concernant la PIV nous ont permis d'établir un schéma plus complet de la PIV (Figure 32).

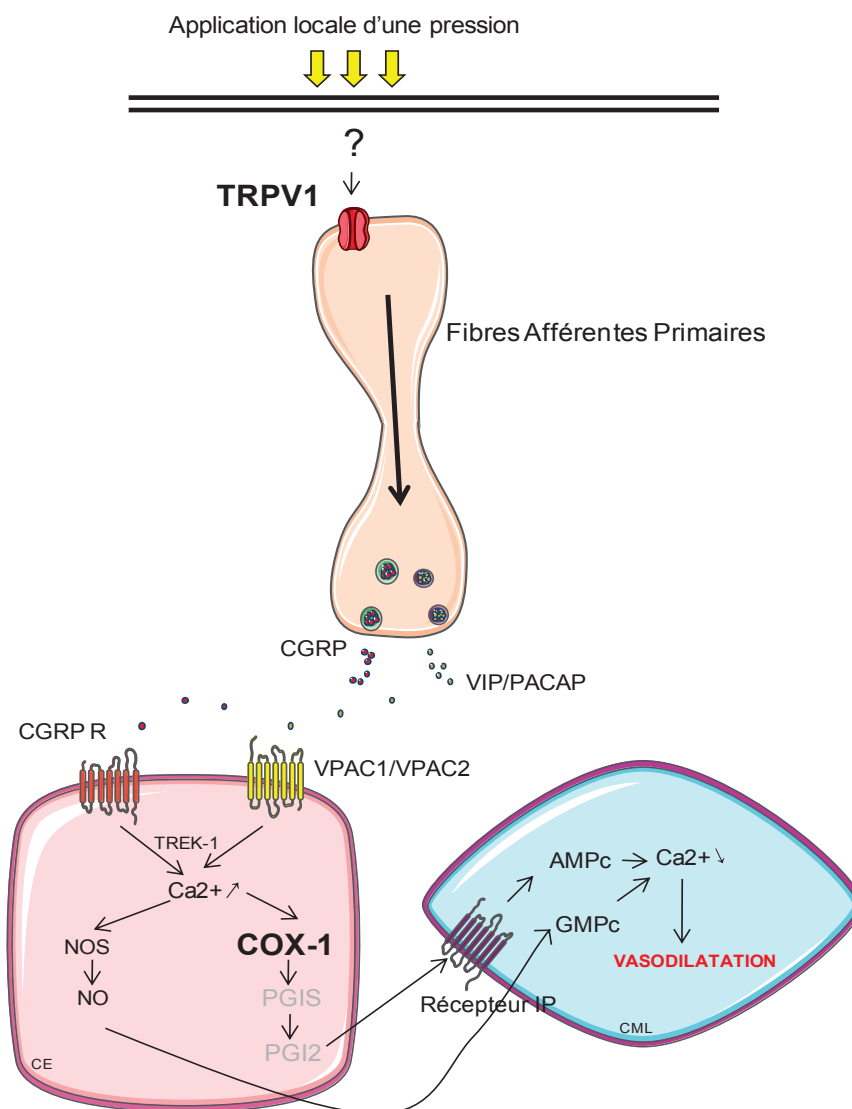


Figure 32. Schéma mécanistique de la vasodilatation induite par une pression locale au niveau cutané.

Implication du contrôle spinal dans la PIV

Des études précédentes avaient suggéré que la PIV n'était pas un mécanisme purement local mais qu'il pouvait subir l'influence du système nerveux central (Fizanne et al. 2003; Fromy et al. 2007). En réalisant une rachianesthésie, nous avons démontré l'implication de la voie spinale dans la PIV. L'administration intrathécale d'antagonistes spécifiques a permis de montrer la participation des récepteurs spinaux TRPV1, CGRP, NMDA et non-NMDA précisant le contrôle spinal de la PIV.

Basé sur les rôles et les actions de ces candidats au niveau spinal lors d'un processus douloureux (Cui et al. 2006; Sun et al. 2004a; Zhou et al. 2009), nous proposons un schéma mécanistique de la PIV au niveau spinal (Figure 33).

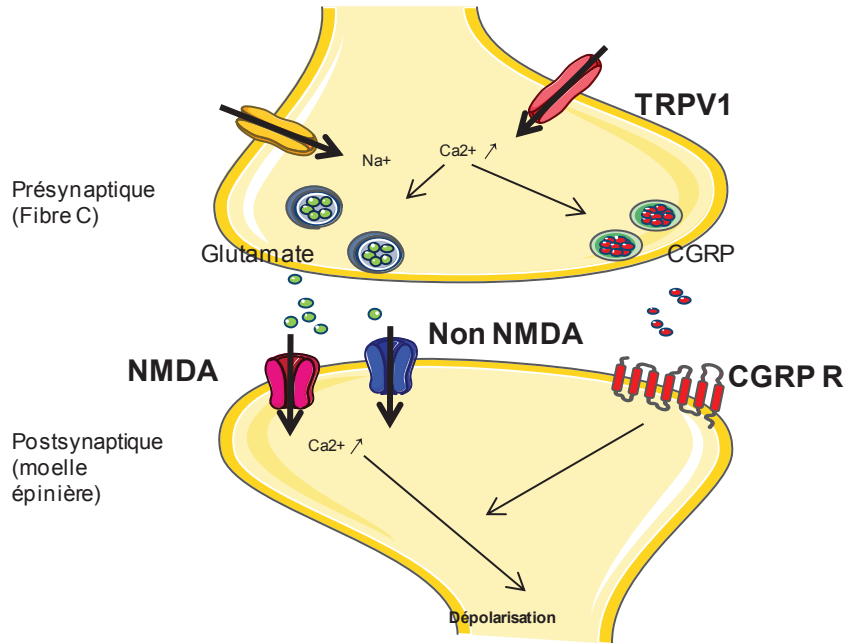


Figure 33. Schéma mécanistique de la vasodilatation induite par une pression locale au niveau spinal.

Perte de la PIV corrélée avec l'augmentation de l'incidence d'escarres

Les études antérieures concouraient à l'importance de la PIV dans la protection de la peau vis-vis des escarres puisque plusieurs facteurs de risque ont un effet néfaste sur ce mécanisme : vieillissement, diabète, douleur, neuropathie périphérique, anesthésie profonde (Fizanne et al. 2003; Fromy et al. 2007; Fromy et al. 2010; Sigaudou-Roussel et al. 2004). Cependant aucune étude n'avait clairement établi le lien entre absence de PIV et incidence augmentée de lésions ischémiques de pression.

Dans une étude, nous avons montré qu'une peau saine privée de PIV suite à un blocage sensoriel spinal avait une ischémie précoce (pour des pressions aussi faible que 3kPa) et une incidence d'escarre augmentée associée à une désorganisation des couches épidermique et dermique de la peau en réponse à une forte compression prolongée (11kPa, 6h).

Ainsi, la perte de la PIV est directement corrélée avec l'augmentation du risque d'escarres.

PIV, un bon outil d'étude de l'intégrité de la microcirculation cutanée et du mécanisme d'escarres

Les escarres constituent un problème de santé publique et altèrent sensiblement la qualité de vie des patients ainsi qu'un fardeau financier aux services de santé (Severens et al 2002). De nombreux facteurs de risques associés à l'incidence accrue d'escarres ont été identifiés (le manque d'activité ou de mobilité, l'incontinence, les anomalies alimentaires, le diabète, le vieillissement, et l'altération de la conscience). En revanche, peu d'études travaillent sur les mécanismes conduisant à la formation d'escarre. Des outils de prévision basés sur cette large gamme des facteurs de risques ont été utilisés pour identifier les populations spécifiques dites à risque d'escarres et pour réduire l'incidence des escarres. Cependant, ces outils tendent à surestimer le risque et aucun outil technique n'est mis à la disposition des cliniciens afin de distinguer les personnes susceptibles de développer des escarres parmi les populations dites à risque d'escarres (Bartus et Swerlick, 2010).

L'application progressive d'une pression locale permet d'évaluer la capacité de la peau à se protéger contre les pressions. Il serait donc intéressant de développer des outils pour faciliter l'évaluation de cette protection physiologique de la peau.

2) La CIV en conditions physiologiques

L'application d'un courant galvanique non nociceptif provoque l'augmentation du flux sanguin cutané (CIV) en conditions physiologiques. Découverte et étudiée principalement chez l'homme, nous avons développé un modèle animal (rat: 240s ; 100 μ A). Les résultats obtenus au cours de ma thèse à partir de ce modèle animal ont permis d'approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans la CIV en conditions physiologiques en périphérie (Figures 32 et 33) et au niveau spinal (Figure 34).

Implication des prostacyclines endogènes :

L'implication des cyclooxygénases (COX) et plus particulièrement des COX-1 dans la CIV anodale avait été fortement suggérée chez l'homme en montrant que la COX-2 ne modifiait pas la CIV (Durand et al. 2002b; Tartas et al. 2005a; Tartas et al. 2005b).

En utilisant des inhibiteurs spécifiques, nous avons montré l'implication de la voie COX-1/PGIS/PGI2/IP dans la CIV cathodale chez le rat sain. Nous avons ainsi pu proposer un schéma mécanistique de la vasodilatation induite par le courant cathodal au niveau vasculaire (Figure 34).

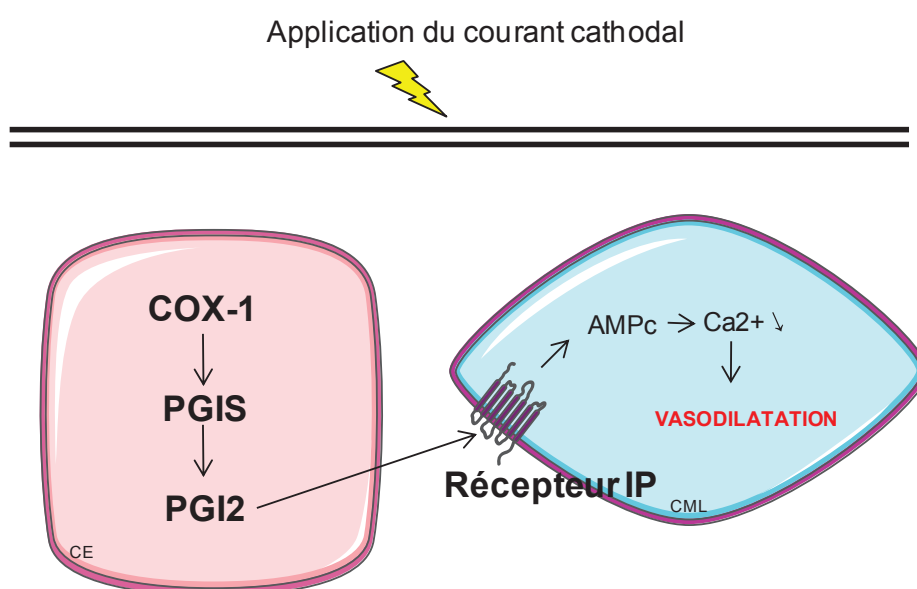


Figure 34. Schéma mécanistique de la vasodilatation induite par le courant cathodal avec l'implication des prostacyclines endogènes.

Implication des récepteurs et neuropeptides des fibres capsaïcino-sensibles :

L'implication des fibres capsaïcino-sensibles avait été mise en évidence chez l'homme grâce à l'application chronique de capsaïcine entraînant une réduction de la CIV (Durand et al. 2002a). En utilisant des inhibiteurs spécifiques, nous avons mis en évidence l'implication des récepteurs TRPV1 et ASIC cutanés et l'implication des neuropeptides CGRP et SP cutanés dans la CIV. De plus, nos résultats montrent une légère acidification de la peau en réponse à l'application du courant qui pourrait initier l'activation des récepteurs TRPV1 et ASIC sensibles à l'acidose.

La CIV, de l'activation de la fibre nerveuse à la vasodilatation du muscle lisse vasculaire

En s'appuyant sur les connaissances issues de la littérature (Franco-Cereceda et al. 1994) et sur l'ensemble des résultats concernant la CIV en périphérie, un schéma général intégrant le versant nerveux et vasculaire du mécanisme de la CIV a pu être réalisé partant de l'activation de la fibre nerveuse capsaïcino-sensible à la vasodilatation du muscle lisse vasculaire (Figure 33).

Les nocicepteurs TRPV1/ASIC sont activés à des gammes de pH différents. Ainsi, il est classiquement démontré que des baisses de pH modérées suffisent pour activer les ASIC (Jones et al. 2004; Lingueglia 2007; Ugawa et al. 2002) alors que les TRPV1 sont activés par une acidose plus importante avec des valeurs de pH inférieures à 6 (Caterina et al. 2001; Holzer 2009; Tominaga et al. 1998). Chez le rat, le pH de surface, suite à la stimulation électrique cathodale a diminué de 6.1 à 5.7. On peut émettre l'hypothèse que les canaux ASIC seraient activés en premier et qu'ils seraient responsables de la fuite de protons dans le milieu extracellulaire entraînant une plus forte acidification et conduisant à l'activation des TRPV1 dans un deuxième temps.

L'activation des ASICs et des TRPV1 par les protons va permettre l'entrée de calcium et de sodium responsable de la dépolarisation des fibres C et de la propagation d'un potentiel d'action. Ces potentiels d'actions vont permettre la libération des neuropeptides tels que le CGRP et la SP comme précédemment décrit dans d'autres études (Faisy et al. 2007; Fischer et al. 2003; Nakanishi et al.; Strecker et al. 2005).

Une fois libérés au niveau cutané, le CGRP et la SP vont se fixer respectivement sur leurs récepteurs couplés aux protéines G présents principalement sur l'endothélium et peu sur

les cellules musculaires lisses (Hagner et al. 2002). Au niveau de l'endothélium, l'activation de ces récepteurs va stimuler la phospholipase C qui va permettre la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) et provoquer la libération du calcium (Brain et al. 2004). La libération de ce calcium va induire l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) (Mitchell et al. 1999). Une fois libéré et par le biais des phospholipides membranaires, l'acide arachidonique va être synthétisé et disponible pour le métabolisme des cyclooxygénases (COX). Dans les cellules endothéliales en conditions physiologiques, COX-1 et PGIS sont les enzymes prédominantes permettant la production endogène des PGI2 (Mitchell et al. 2006). Dans les plaquettes, les COX-1 ont tendance à synthétiser principalement du thromboxane A2 (vasoconstricteur) avec des niveaux négligeables de PGIS (Needleman et al. 1976). Ceci suggère le rôle prédominant de COX-1 endothéliale dans la CIV cathodale chez le rat.

Une fois libérées, les prostacyclines vont se fixer sur leurs récepteurs IP couplés à des protéines G présents au niveau des cellules musculaires lisses (Stitham et al. 2007). L'activation des récepteurs IP a pour conséquence celle de l'adenylate cyclase menant à la formation de l'AMPc. L'AMPc via la protéine kinase A va conduire finalement à la réduction de calcium et donc à la relaxation des cellules musculaires (Schwarz et al. 2001).

Nous pouvons donc proposer un schéma mécanistique de l'initiateur jusqu'à la vasodilatation induite par le courant au niveau cutané (Figure 35).

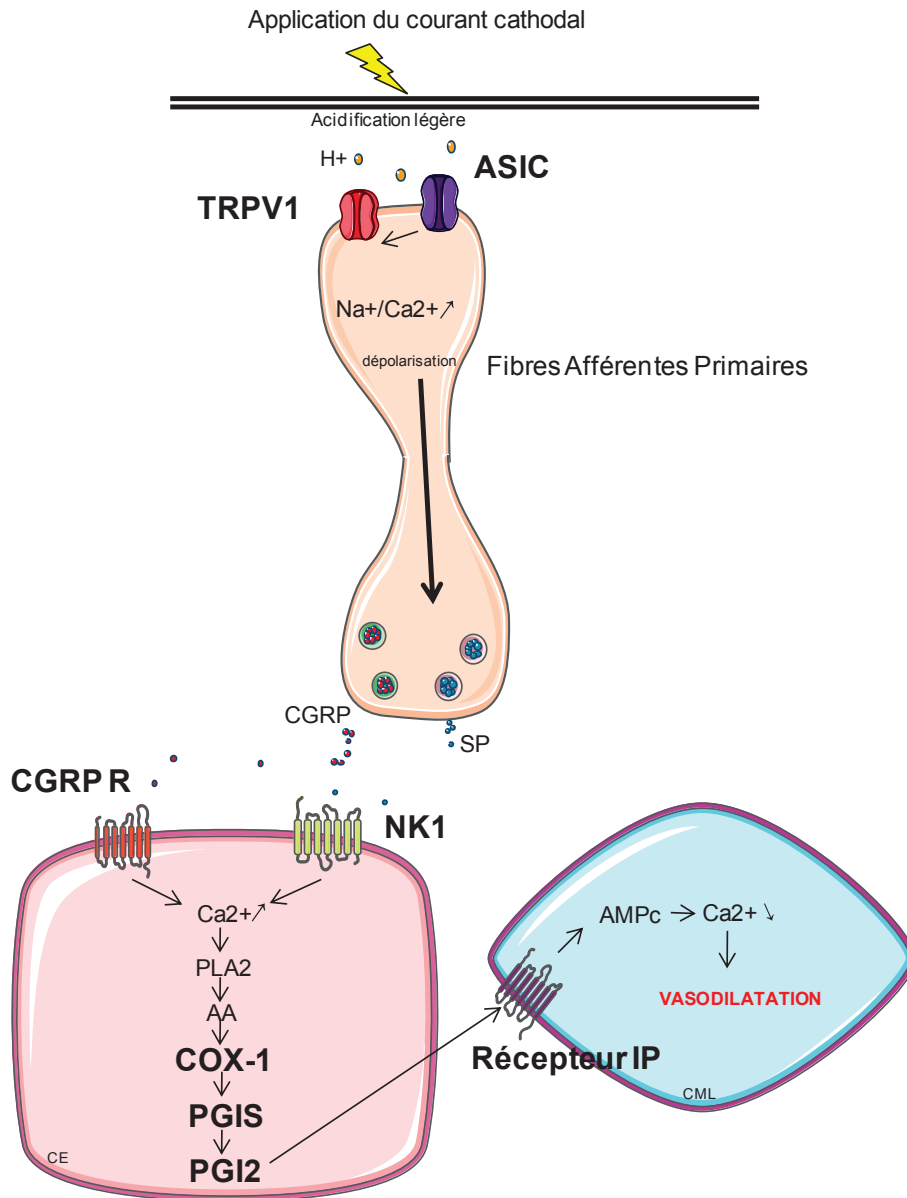


Figure 35. Schéma mécanistique de la vasodilatation induite par le courant cathodal.

Implication du contrôle spinal dans la CIV

Les études antérieures présentaient la CIV comme un mécanisme axone réflexe suggérant l'implication partielle du SNC. L'injection intrathécale d'un anesthésique locale et d'antagonistes a permis de montrer un contrôle partiel avec la participation des récepteurs/canaux spinaux TRPV1, CGRP, NMDA et non-NMDA dans la CIV cathodale chez le rat sain. Nous avons ainsi pu proposer un schéma mécanistique de la vasodilatation induite par le courant avec un contrôle spinal partiel en se basant sur la nociception (Cui et al. 2006; Lin et al. 2007; Zhou et al. 2009) (Figure 36).

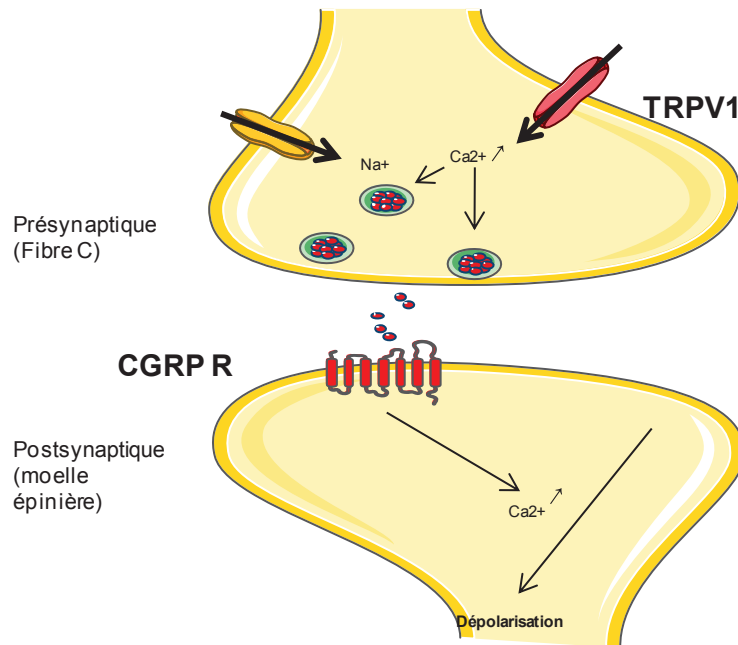


Figure 36. Schéma mécanistique de la vasodilatation induite par le courant cathodal avec l'influence du système nerveux central.

CIV, mécanisme axone réflexe sans inflammation neurogénique

Dans le cadre de la douleur, un mécanisme axone réflexe est caractérisé à la fois par un flare et une inflammation neurogénique.

A de fortes intensités, l'application du courant peut entraîner des réponses inflammatoires (Dusch et al. 2009), à l'inverse des faibles intensités (Dusch et al. 2007).

En mesurant le flux sanguin cutané à distance et en prélevant des biopsies de peau pour les analyses histologiques, nous avons montré l'absence de flare, d'œdème et d'inflammation en réponse à l'application d'un courant cathodale (240s ; 100 μ A) chez le rat sain (modèle animal que nous avons développé).

CIV, un bon outil d'étude de l'intégrité des prostacyclines endogènes

En conclusion, la CIV pourrait servir d'outil de diagnostic pour évaluer les prostacyclines endogènes cutanées sans induire d'inflammation neurogénique. Ainsi, il serait intéressant de développer la mise en place en milieu hospitalier de cet outil permettant le reflet de l'intégrité des prostacyclines endogènes dans la microcirculation cutanée.

Les iontophorèses d'acétylcholine et la CIV pourraient conjointement être de bons outils pour explorer les voies du NO et des PGI₂.

Synthèse

1) Rôle potentialisateur des prostacyclines sur les fibres nerveuses

En plus de son rôle de vasodilatateur, des études ont montré que les prostacyclines exogènes pouvaient jouer un rôle de sensibilisateur sur les fibres sensorielles via les TRPV1 et le CGRP (Kallner et al. 1998).

Des études in vitro ont montré que la prostacycline sensibilise les fibres sensorielles en augmentant le relargage des neuropeptides (SP et le CGRP) via le TRPV1 (Fukushima et al. 2006; Hingtgen et al. 1994; Hingtgen et al. 1995), même si le mécanisme reste inconnu. L'implication d'un second messager, l'AMPC et sa cascade ont été suggérés (Hingtgen et al. 1995).

La CIV cathodale est dépendante des prostacyclines endogènes qui pourraient avoir un rôle de sensibilisateur (Figure 37A). De plus, même si pour la PIV l'implication des prostacyclines reste à prouver, elles pourraient jouer ce même rôle (Figure 37B).

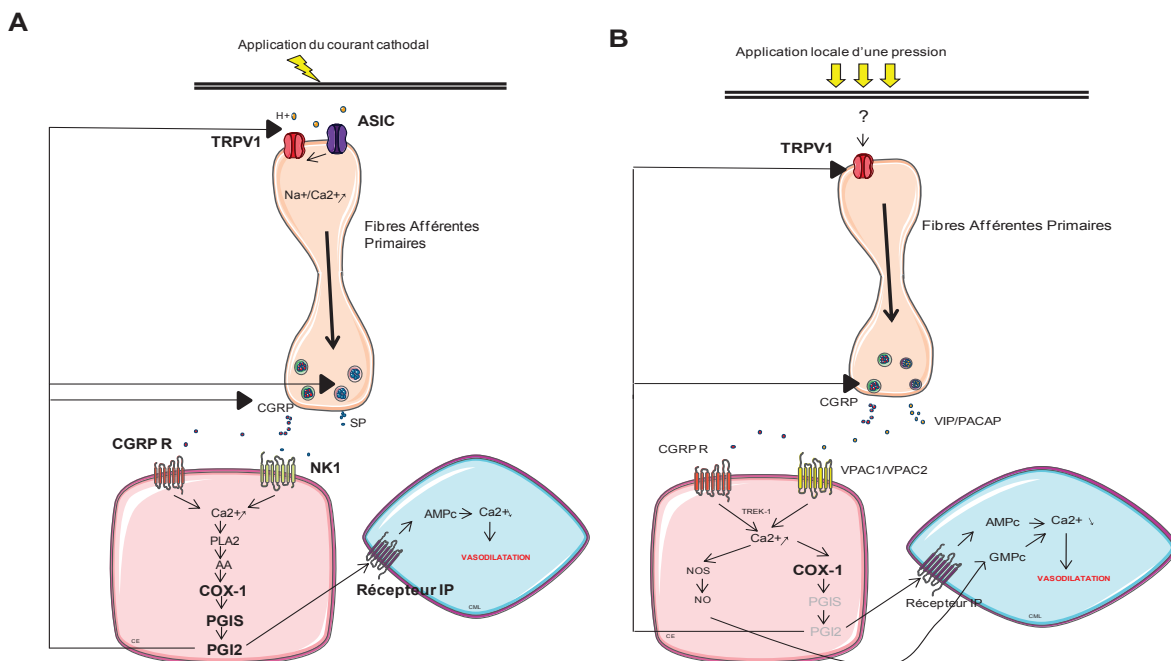


Figure 37. Hypothétique rôle des PGI2 comme sensibilisateur sur les fibres nerveuses dans la CIV cathodale (A) et dans la PIV (B).

2) Candidats endogènes possibles des TRPV1 au niveau spinal

Bien que la pression et le courant soient de faible intensité et décrits comme étant non douloureux par les patients, certains mécanismes impliqués dans la PIV et la CIV comme la participation des fibres capsaïcino-sensibles sont souvent reportés dans la nociception (Lynn 1992).

Le rôle des TRPV1 au niveau spinal a été montré dans la PIV et partiellement dans la CIV mais son action et son activation restent encore à préciser. Activés par la douleur et l'acidose en périphérie, plusieurs agonistes endogènes des TRPV1 spinaux sont cependant décrits dans la modulation centrale de la douleur (Spicarova et al. 2008; Starowicz et al. 2007), comme l'anandamine (un ligand endogène des récepteurs de cannabinoïdes) (Zygmunt et al. 1999), des produits de la lipoxygénases au niveau des membranes de neurones sensoriels (12- and 15-HPETE, 5- et 15-HETE) (Hwang et al. 2000) et enfin la N-arachidonoyl-dopamine (NADA). Le NADA est retrouvé dans les DRG et il a la capacité de stimuler de manière significative le relargage de la SP et du CGRP au niveau de la moelle épinière du rat après avoir activé les récepteurs TRPV1. Cet effet du NADA a été supprimé par l'antagoniste des TRPV1, le manque de calcium extracellulaire, et le traitement préparatoire des coupes de DRG avec de la capsaïcine, démontrant son rôle d'agoniste du TRPV1 (Huang et al. 2002). D'autres candidats dérivant des acides gras polyinsaturés oméga-3 ont été démontrés. Par exemple, l'acide docosahexaénoïque peut agir en tant qu'agoniste, tandis que l'acide eicosapentaénoïque et l'acide linoléique ont des effets inhibiteurs sur les récepteurs TRPV1 (Matta et al. 2007). Si nos études ne nous permettent pas d'établir quel agoniste est responsable de l'activation des TRPV1 spinaux, d'après l'abondante littérature dans ce domaine, nous émettons l'hypothèse qu'après l'activation des récepteurs spinaux TRPV1, l'augmentation calcique induit probablement le relargage du CGRP et du glutamate.

3) Similitudes et différences entre la PIV, la CIV et l'inflammation neurogénique

Nos études ont pu mettre en évidence que les mécanismes de la PIV et de la CIV sont deux mécanismes neurovasculaires ayant des similitudes et des différences avec l'inflammation neurogénique.

En périphérie :

Les stimuli sont différents en nature (pression, courant) et en intensité (faible et forte) entre ces trois mécanismes neurovasculaires :

- La PIV est obtenue en réponse à l'application progressive d'une pression locale non douloureuse
- La CIV fait suite à l'application instantanée d'un courant continu non douloureux.
- Et l'inflammation neurogénique répond à une stimulation douloureuse de forte intensité.

Au vu de ces différences de stimulation, nous pouvons classer ces trois mécanismes neurovasculaires par ordre d'intensité de la stimulation : PIV < CIV < inflammation neurogénique.

L'initiateur de la cascade de la PIV reste inconnu. Cependant nous émettons l'hypothèse que les fibres afférentes primaires seront excitées suite à l'activation d'un récepteur mécanosensible en réponse à la déformation des cellules de la peau provoquée par la pression. Plusieurs candidats sont possibles et les récepteurs de la famille des DEG/ENaC retiennent toute notre attention (Arnadottir et al. 2010). D'après nos études, l'initiateur de la CIV semblerait être l'acidose induite par le courant électrique. La douleur peut être de type mécanique, thermique ou chimique conduisant à l'activation de différents canaux initiant l'inflammation neurogénique (Scholz et al. 2002).

Même si les initiateurs et les canaux activés sont différents, l'activation des fibres afférentes primaires capsaïcino-sensibles est commune entre ces trois vasodilatations (Durand et al. 2002a; Fromy et al. 1998; Fromy et al. 2000). En effet, les fibres capsaïcino-sensibles peuvent répondre à des stimuli douloureux et non douloureux (Delmas et al. 2011; Perl 2007).

Concernant la fonction efférente de ces fibres capsaïcino-sensibles, la PIV dépend uniquement du CGRP et non de la SP (Fromy et al. 2000). La CIV est dépendante des neuropeptides CGRP et SP (Gohin et al, en soumission) tout comme l'inflammation neurogénique (Cao et al. 1998). Cette différence est cohérente avec notre hypothèse selon laquelle le seuil de stimulation est de plus en plus intense suivant l'ordre PIV<CIV<inflammation neurogénique. Nos résultats suggèrent que l'application d'un courant cathodal non douloureux était suffisamment intense pour libérer de la SP. En effet, à faible concentration (<10⁻⁸M), la SP provoque une vasodilatation sans engendrer de sensation douloureuse, qui n'apparaît qu'à des concentrations 50 à 1000 fois plus élevées (Petersen et al. 1997a; Petersen et al. 1997b; Weidner et al. 2000). Nous faisons l'hypothèse que la production de SP en périphérie est proportionnelle à l'intensité du stimulus appliqué c'est-à-dire quasi nulle dans la PIV et modérée dans la CIV en comparaison de la concentration libérée lors de l'inflammation neurogénique.

La douleur induit une inflammation neurogénique accompagnée d'un flare (Basbaum et al. 2009). Lors d'une PIV, nous n'avons jamais observé visuellement de flare chez l'homme et chez le rat. En mesurant le flux sanguin cutané à 20mm de la stimulation, nos résultats ont démontré que la CIV (240s ; 0.1mA) n'était pas accompagnée de flare, ni d'inflammation. Une libération modérée de SP n'induit pas de flare (Weidner et al. 2000). Par conséquent, le classement (PIV<CIV<inflammation neurogénique) est cohérent avec la quantité de SP produite et l'absence ou présence de flare.

Concernant le rôle des facteurs endothéliaux vasodilatateurs, le NO et les prostaglandines sont impliqués dans la PIV (Fromy et al. 2000), alors que les prostacyclines prédominent dans la CIV (Gohin et al. 2011). Dans le cadre de la douleur et de l'axone réflexe, ce sont principalement les prostaglandines (PGE₂) synthétisées par les COX-2 qui sont impliquées dans l'inflammation neurogénique (Chen et al. 1999; Rukwied et al. 2007; Southall et al. 2003; White 1996).

Le NO est libéré en continu permettant le maintien du tonus basal tandis que la prostacycline est plus transitoire car sa libération est déclenchée par un stimulus (Harrington et al. 2007; Luckhoff et al. 1988). Nous émettons l'hypothèse que le rôle du NO dans la PIV intervient dans les pressions les plus faibles alors que les prostaglandines sont libérées secondairement sous des pressions plus importantes. A l'inverse, la CIV et l'inflammation

neurogénique sont induites par une stimulation instantanée qui conduit à la libération des PG shuntant la voie du NO.

La différence entre les facteurs endothéliaux impliqués dans ces trois vasodilatations peut trouver une autre explication. Dans les cellules endothéliales, si le relargage du calcium est commun à la synthèse du NO et à celle des prostacyclines, sa cinétique est différente (Mitchell et al. 2008). En effet, la synthèse des prostacyclines via les PLA2 nécessite de plus fortes concentrations de calcium que celle pour la synthèse du NO (Luckhoff et al. 1988; Mitchell et al. 2008). Dans le cas de la CIV, nous pouvons émettre l'hypothèse que la concentration de Ca²⁺ libérée était suffisamment importante pour activer la PLA2. Ceci pourrait nous faire penser que la stimulation électrique est capable d'induire de plus fortes concentrations de Ca²⁺, alors que la pression responsable de la PIV conduirait à la production de faibles concentrations de calcium.

Au niveau spinal :

Au niveau spinal, la PIV a besoin d'une transduction sensorielle intacte pour se développer alors que la CIV, qui est un mécanisme axone réflexe induisant l'activation d'une fonction afférente-efférente des fibres activées, n'a besoin qu'en partie d'une transduction sensorielle spinale pour se développer tout comme l'inflammation neurogénique (Gamse et al. 1979; Guirimand et al. 1996; Huang et al. 2002; Lin et al. 2007; Scholz et al. 2002; Yanagidate et al. 2006; Yang et al. 1998b).

Le contrôle spinal partiel dans la CIV et dans l'inflammation neurogénique ou le contrôle spinal total dans la PIV pourrait s'expliquer par les différences d'intensité du stimulus. La PIV résulte d'une pression progressive non douloureuse permettant l'intégration de l'information à un niveau central, comme rapporté dans le cadre du toucher (Berkley et al. 1995). A l'inverse, concernant la CIV et l'inflammation neurogénique, l'application d'un stimulus instantané modéré à intense provoque une réponse de type axone réflexe qui persiste lors du blocage spinal pharmacologique ou pathologique (Kauppila et al. 2002; Kuesgen et al. 2002).

Même si l'influence du contrôle spinal est différente entre la PIV, la CIV et l'inflammation neurogénique, les mécanismes impliqués sont communs (canaux/récepteurs TRPV1 et CGRP spinaux). Les NMDA et non NMDA au niveau spinal sont également

communs entre la transmission spinale de la PIV et d'autres vasodilatations induites par un stimulus douloureux périphérique.

Perspectives

Bien que la compréhension des mécanismes impliqués dans la PIV et dans la CIV cathodale a avancé, de nombreux points restent à éclaircir.

1) La PIV

Le mécanisme spinal de la PIV n'en est encore qu'au début. Ainsi, la PIV a été abolie par injection intrathécale de bupivacaïne, bloqueur non spécifique des canaux sodiques. Or, après avoir mis en évidence l'implication des canaux sodiques dans certaines études, la majorité des auteurs s'intéressent à l'identification des deux classes de canaux sodiques dépendant de leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX). La TTX est une toxine capable de bloquer de façon très sélective les pores des canaux sodium voltage-dépendants, empêchant ainsi le passage de l'influx nerveux de la douleur. Ces canaux sont divisés en deux familles : les canaux dits « sensibles » à la TTX (TTX-S, Nav1.1 à Nav1.4, Nav1.6 et Nav1.7) bloqués par de faibles concentrations de TTX et les canaux dits « résistants » (TTX-R, Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9) bloqués par de plus fortes concentrations (Maingret et al. 2008). De plus, les TTX-S sont des canaux à bas seuil dont la cinétique d'inactivation est rapide. Ils sont présents sur la membrane des terminaisons des fibres afférentes primaires, qu'elles soient ou non myélinisées, et sont bloqués par les anesthésiques locaux. En revanche, les canaux sodiques TTX-R ont leur seuil élevé, leur cinétique d'inactivation est lente et ils sont plus souvent associés à des mécanismes inflammatoires (Le Bars et al. 2002). Nous émettons l'hypothèse que la PIV serait réduite par l'injection intrathécale de TTX. Il serait donc intéressant de savoir si la PIV est bloquée ou non par la tétrodotoxine afin de cibler les canaux sodiques à étudier par la suite.

La substance P est retrouvée au niveau spinal comme neuromodulateur dans les réponses nociceptives. Même si son rôle avait été exclu dans la PIV par injection intraveineuse, il reste intéressant de vérifier si la PIV est dépendante ou non de la SP au niveau spinal. D'après nos connaissances sur la PIV (non nociceptif), la SP ne devrait pas être impliquée au niveau spinal.

Au niveau spinal, nous avons mis en évidence le rôle glutamatergique (fonction excitatrice des neurotransmetteurs) dans la PIV. Or cette fonction est liée à une balance excitatrice/inhibitrice au niveau spinal caractérisée par un équilibre entre le glutamate et le neurotransmetteur inhibiteur principal, le GABA (Acide gamma amino butyrique). Grâce à des inhibiteurs spécifiques, il serait intéressant de vérifier leur participation dans le développement de la PIV afin de poursuivre le modèle mécanistique de la PIV au niveau spinal.

Un dernier axe de recherche s'orientera sur l'étude de la PIV et son impact dans l'incidence des escarres dans des pathologies présentant des défauts au niveau de la transmission spinale. Une étude sur des rats paraplégiques pourrait être particulièrement intéressante afin de voir si dans un modèle chronique, la PIV est absente ou si des mécanismes compensateurs existent comme rapportés au cours du vieillissement avec l'EDHF (Fromy et al. 2010). Dans ces conditions pathologiques, si la PIV est absente, est-il possible de la restaurer pour rendre une protection cutanée face aux lésions ischémiques ?

2) La CIV

La mise en place d'un modèle animal nous a permis d'affiner les mécanismes physiologiques impliqués dans la CIV cathodale. D'autres études mécanistiques pourraient être développées par la suite comme l'étude de l'implication des COX endothéliales, neuronales ou plaquettaires grâce à une étude dynamique de réapparition de CIV après injection d'aspirine mais aussi une étude sur le flare en augmentant de l'intensité ou la durée d'application du courant.

Il serait intéressant de regarder ce qui se passe dans le cadre d'une pathologie affectant un ou plusieurs éléments impliqués dans la CIV. Le syndrome de Raynaud est caractérisé par une défaillance dans la balance vasodilatateur/vasoconstricteur de la microcirculation (PGI₂/TxA₂) (Jones and Hawkey, 1983). L'un des traitements de cette pathologie est l'infusion de prostacyclines (Belch et al. 1983). De plus, le syndrome de Raynaud est multifactoriel et l'implication du CGRP a également été suspectée (Brain et al. 2004). Nos études ont démontré la dépendance des PGI₂ endogènes mais aussi du CGRP dans la CIV cathodale. La CIV cathodale serait-elle modifiée chez ces patients ? Existents-ils des

mécanismes compensateurs comme dans le cadre du diabète avec l'insuline ? Peut-on restaurer la perte de la CIV chez ses patients ?

Un autre axe de recherche concernant la CIV pourrait être son utilisation dans l'accélération de la cicatrisation d'une plaie sur animal sain dans un premier temps puis pathologique (diabète, vieillissement) avec des défauts de cicatrisation dans un deuxième temps.

Une stimulation électrique est utilisée en thérapeutique pour améliorer la cicatrisation depuis les années 60. Il existe quatre types de stimulation électrique (courant continu faible intensité, courant pulsé faible intensité, courant pulsé et stimulation électrique nerveuse transcutanée) qui montrent cet effet bénéfique sur les plaies chroniques de type escarres (Mehmandoust et al. 2007). Celui qui se rapproche le plus de la CIV cathodale est l'utilisation du courant continu de faible intensité (Gault et al. 1976; Mehmandoust et al. 2007). Bien que son efficacité soit prouvée par différentes études réalisées chez l'homme, les mécanismes mis en jeu sont peu étudiés. Les explications couramment données pour justifier ce phénomène sont l'effet antibactérien du courant (Rowley 1972) et la galvanotaxie qui induit la migration des cellules épithéliales et des kératinocytes au niveau de la plaie ainsi que leur prolifération (Ojingwa et al. 2003). Cependant, l'efficacité du courant sur les plaies n'est pas encore totalement élucidée.

Nos résultats sur la CIV cathodale ont mis en évidence que le courant cathodal induit une production endogène des PGI₂ et une légère acidification (initiateur). Nous pouvons donc penser que le courant cathodal de faible intensité pourrait avoir un effet bénéfique sur la cicatrisation suite à la libération de PGI₂ qui permettrait un apport plus important et plus rapide des cellules inflammatoires sur le site de la plaie. De plus, l'acidose est un critère indispensable dans le processus de cicatrisation.

L'influence bénéfique du courant cathodal de faible intensité sur la cicatrisation reste à prouver sur une peau lésée.

Conclusion générale

Des facteurs de risque associés à l'incidence accrue d'escarres ont été identifiés mais très peu d'études s'intéressent aux mécanismes de la physiopathologie de l'escarre. Les escarres constituent un problème majeur pour les patients et pour le personnel soignant en milieu hospitalier (Severens et al. 2002).

Nos études ont montré que le blocage de la transduction sensorielle spinale conduisait à la perte de la PIV et à l'augmentation de l'incidence d'escarres. Or la PIV a longtemps été suggérée comme étant un mécanisme protecteur naturel qui retarde l'ischémie. En l'absence de perception sensorielle spinale, la peau ne bénéficie plus de protection telle que la PIV pour lutter contre l'ischémie provoquée par la pression. Ainsi dans une peau privée de PIV, nous avons observé un écrasement pour des pressions deux fois plus faibles et une incidence d'escarres 3 fois plus importante par rapport à une peau qui bénéficie d'une PIV. Par conséquent, l'étude de la PIV offre un outil diagnostique intéressant pour évaluer les capacités protectrices de la peau contre les lésions ischémiques de pression. Il serait intéressant de poursuivre la compréhension des mécanismes qui provoquent la perte de la PIV dans certaines pathologies associées à un fort risque d'escarres pour mieux appréhender la prévention et/ou la restauration de la PIV dans ces populations à risques (exemple patients paraplégiques).

En parallèle, il est important de poursuivre la compréhension des mécanismes permettant de favoriser leur cicatrisation par le courant. L'élucidation des mécanismes de la CIV doit donc être poursuivie pour favoriser la cicatrisation dans les cas pathologiques.

Annexe 1

Involvement of endogenous prostacyclin in current stimulation in rat healthy skin *in vivo*

Stéphanie GOHIN, Bérengère FROMY, Jean Louis SAUMET
FRE CNRS 3075, University of Lyon 1, Lyon, France



Introduction

In the endothelial function, prostacyclin (PGI₂) is as important as nitric oxide, however no test assesses specifically the vascular function of endogenous PGI₂.

It exists a significant increase in the cutaneous blood flow in response to non noxious galvanic current application in humans. This current-induced vasodilation (CIV) is sensitive to a non specific inhibitors of COX but not sensitive a specific COX-2 inhibitor, suggesting the role of COX-1. We hypothesized that PGI₂ plays a dominant role in CIV.

We first aimed to verify the existence of CIV in healthy rats and further precise its underlying mechanism (COX/NOS involvement) in comparison to the Acetylcholine (Ach) – mediated vasodilation.

Methods

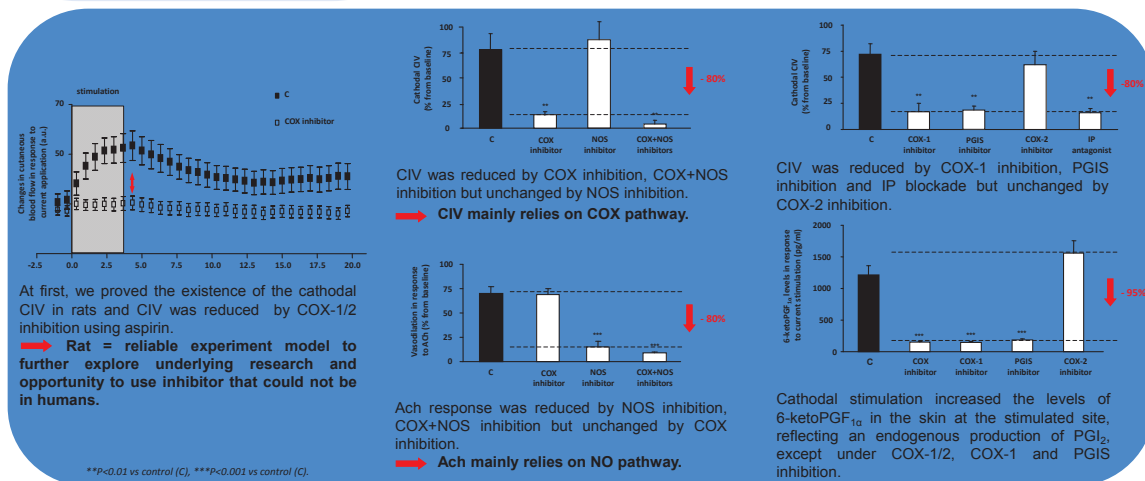
Wistar rats weighing 200-400g.
CIV assessment : cathodal stimulation (240s, 0.1mA) with deionized water
Ach assessment: anodal stimulation (20s, 0.1mA) with Ach (2%)

Used inhibitors (intravenous injection)

- COX inhibitor : Aspirin, 50 mg kg⁻¹
- NOS inhibitor : LNNA, 20 mg kg⁻¹
- COX-1 inhibitor : SC560, 2.5 mg kg⁻¹
- COX-2 inhibitor : SC58125, 5 mg kg⁻¹
- PGIS inhibitor : U51605, 0.6 mg kg⁻¹
- IP receptor antagonist : CAY10441, 6 mg kg⁻¹

Measurement of skin blood flow using laser Doppler flowmetry
Measurement of 6 keto PGF_{1α} levels in skin using kit ELISA.

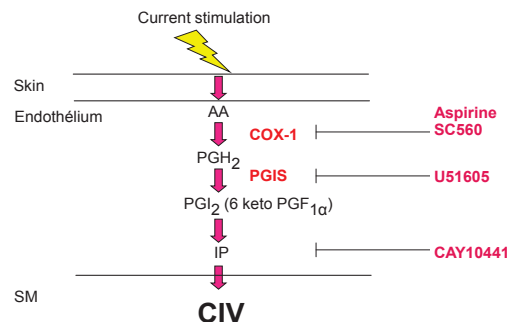
Results



Conclusion

Cathodal CIV mainly relies on the release of PGI₂ endogenously produced through COX1/PGIS pathway and than acts on IP receptors to relax cutaneous microvessels in healthy rats.

→ CIV is a valuable method to test the vascular function of endogenous PGI₂ in healthy skin.



S GOHIN *et al* J Invest Dermatol (in press)

Bibliographie

- Abraham P., Fromy B., Merzeau S., Jardel A. and Saumet J. L. (2001). "Dynamics of local pressure-induced cutaneous vasodilation in the human hand." *Microvasc Res* **61**: 122-129.
- Arnadottir J. and Chalfie M. (2010). "Eukaryotic mechanosensitive channels." *Annu Rev Biophys* **39**: 111-137.
- Asberg A., Holm T., Vassbotn T., Andreassen A. K. and Hartmann A. (1999). "Nonspecific microvascular vasodilation during iontophoresis is attenuated by application of hyperosmolar saline." *Microvasc Res* **58**: 41-48.
- Averbeck B. and Reeh P. W. (2001). "Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E(2) from isolated rat skin." *Neuropharmacology* **40**: 416-423.
- Axelsson H. E., Minde J. K., Sonesson A., Toolanen G., Hogestatt E. D. and Zygmunt P. M. (2009). "Transient receptor potential vanilloid 1, vanilloid 2 and melastatin 8 immunoreactive nerve fibers in human skin from individuals with and without Norrbottnian congenital insensitivity to pain." *Neuroscience* **162**: 1322-1332.
- Aye N. N., Xue Y. X. and Hashimoto K. (1997). "Antiarrhythmic effects of cariporide, a novel Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on reperfusion ventricular arrhythmias in rat hearts." *Eur J Pharmacol* **339**: 121-127.
- Bartus C. and Swerlick R. (2010). "It is better to flush than to break under pressure." *J Invest Dermatol* **130**: 650-651.
- Basbaum A. I., Bautista D. M., Scherrer G. and Julius D. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." *Cell* **139**: 267-284.
- Behne M. J., Meyer J. W., Hanson K. M., Barry N. P., Murata S., Crumrine D., Clegg R. W., Gratton E., Holleran W. M., Elias P. M. and Mauro T. M. (2002). "NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging." *J Biol Chem* **277**: 47399-47406.
- Belch J. J., Newman P., Drury J. K., McKenzie F., Capell H., Leiberman P., Forbes C. D. and Prentice C. R. (1983). "Intermittent epoprostenol (prostacyclin) infusion in patients with Raynaud's syndrome. A double-blind controlled trial." *Lancet* **1**: 313-315.
- Benrath J., Eschenfelder C., Zimmerman M. and Gillardon F. (1995). "Calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide are involved in cutaneous inflammation following ultraviolet irradiation." *Eur J Pharmacol* **293**: 87-96.
- Berghoff M., Kathpal M., Kilo S., Hilz M. J. and Freeman R. (2002). "Vascular and neural mechanisms of ACh-mediated vasodilation in the forearm cutaneous microcirculation." *J Appl Physiol* **92**: 780-788.
- Berkley K. J. and Hubscher C. H. (1995). "Are there separate central nervous system pathways for touch and pain?" *Nat Med* **1**: 766-773.
- Berliner M. N. (1997a). "Reduced skin hyperemia during tap water iontophoresis after intake of acetylsalicylic acid." *Am J Phys Med Rehabil* **76**: 482-487.
- Berliner M. N. (1997b). "Skin microcirculation during tapwater iontophoresis in humans: cathode stimulates more than anode." *Microvasc Res* **54**: 74-80.

- Betts and Franks (1991). Foot pressure studies: normal and pathological gait analysis. *Discorders of foot and ankle*. J. M, Saunders WB. **1**.
- Bevan S., Hothi S., Hughes G., James I. F., Rang H. P., Shah K., Walpole C. S. and Yeats J. C. (1992). "Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin." *Br J Pharmacol* **107**: 544-552.
- Bickel A., Heyer G., Senger C., Maihofner C., Heuss D., Hilz M. J. and Namer B. (2009). "C-fiber axon reflex flare size correlates with epidermal nerve fiber density in human skin biopsies." *J Peripher Nerv Syst* **14**: 294-299.
- Bjerring P., Andersen P. H. and Arendt-Nielsen L. (1989). "Vascular response of human skin after analgesia with EMLA cream." *Br J Anaesth* **63**: 655-660.
- Bleakman D., Alt A. and Nisenbaum E. S. (2006). "Glutamate receptors and pain." *Semin Cell Dev Biol* **17**: 592-604.
- Boutillier and Outrequin (2000). Anatomie.
- Brain S. D. and Grant A. D. (2004). "Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin." *Physiol Rev* **84**: 903-934.
- Brain S. D. and Williams T. J. (1988). "Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide." *Nature* **335**: 73-75.
- Braverman I. M. (2000). "The cutaneous microcirculation." *J Investig Dermatol Symp Proc* **5**: 3-9.
- Cao Y. Q., Mantyh P. W., Carlson E. J., Gillespie A. M., Epstein C. J. and Basbaum A. I. (1998). "Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain." *Nature* **392**: 390-394.
- Caterina M. J. and Julius D. (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." *Annu Rev Neurosci* **24**: 487-517.
- Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D. and Julius D. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**: 816-824.
- Caughey G. E., Cleland L. G., Penglis P. S., Gamble J. R. and James M. J. (2001). "Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2." *J Immunol* **167**: 2831-2838.
- Chen C. C., England S., Akopian A. N. and Wood J. N. (1998). "A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10240-10245.
- Chen X., Tanner K. and Levine J. D. (1999). "Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E2 in the rat." *Neurosci Lett* **267**: 105-108.
- Chen Y., Devivo M. J. and Jackson A. B. (2005). "Pressure ulcer prevalence in people with spinal cord injury: age-period-duration effects." *Arch Phys Med Rehabil* **86**: 1208-1213.
- Chu D. Q., Legon S., Smith D. M., Costa S. K., Cuttitta F. and Brain S. D. (2001). "The calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist CGRP(8-37) blocks vasodilatation in inflamed rat skin: involvement of adrenomedullin in addition to CGRP." *Neurosci Lett* **310**: 169-172.
- Coderre T. J. (1993). "Potent analgesia induced in rats by combined action at PCP and polyamine recognition sites of the NMDA receptor complex." *Eur J Neurosci* **5**: 390-393.
- Cracowski J. L., Lorenzo S. and Minson C. T. (2007). "Effects of local anaesthesia on subdermal needle insertion pain and subsequent tests of microvascular function in human." *Eur J Pharmacol* **559**: 150-154.
- Cui M., Honore P., Zhong C., Gauvin D., Mikusa J., Hernandez G., Chandran P., Gomtsyan A., Brown B., Bayburt E. K., Marsh K., Bianchi B., McDonald H., Niforatos W.,

- Neelands T. R., Moreland R. B., Decker M. W., Lee C. H., Sullivan J. P. and Faltynek C. R. (2006). "TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists." *J Neurosci* **26**: 9385-9393.
- Deitrick G., Charalel J., Bauman W. and Tuckman J. (2007). "Reduced arterial circulation to the legs in spinal cord injury as a cause of skin breakdown lesions." *Angiology* **58**: 175-184.
- Delay-Goyet P., Satoh H. and Lundberg J. M. (1992). "Relative involvement of substance P and CGRP mechanisms in antidromic vasodilation in the rat skin." *Acta Physiol Scand* **146**: 537-538.
- Delmas P., Hao J. and Rodat-Despoix L. (2011). "Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons." *Nat Rev Neurosci* **12**: 139-153.
- Demiot C., Fromy B., Saumet J. L. and Sigauco-Roussel D. (2006). "Preservation of pressure-induced cutaneous vasodilation by limiting oxidative stress in short-term diabetic mice." *Cardiovasc Res* **69**: 245-252.
- Deval E., Gasull X., Noel J., Salinas M., Baron A., Diochot S. and Lingueglia E. (2010). "Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain." *Pharmacol Ther* **128**: 549-558.
- Dhaka A., Uzzell V., Dubin A. E., Mathur J., Petrus M., Bandell M. and Patapoutian A. (2009). "TRPV1 is activated by both acidic and basic pH." *J Neurosci* **29**: 153-158.
- Dickenson A. H. (1995). "Spinal cord pharmacology of pain." *Br J Anaesth* **75**: 193-200.
- Dickenson A. H. and Dray A. (1991). "Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception." *Br J Pharmacol* **104**: 1045-1049.
- Diochot S., Salinas M., Baron A., Escoubas P. and Lazdunski M. (2007). "Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels." *Toxicon* **49**: 271-284.
- Droog E. J. and Sjoberg F. (2003). "Nonspecific vasodilatation during transdermal iontophoresis-the effect of voltage over the skin." *Microvasc Res* **65**: 172-178.
- Durand S., Fromy B., Bouye P., Saumet J. L. and Abraham P. (2002a). "Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0.10 mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms." *J Vasc Res* **39**: 59-71.
- Durand S., Fromy B., Bouye P., Saumet J. L. and Abraham P. (2002b). "Vasodilatation in response to repeated anodal current application in the human skin relies on aspirin-sensitive mechanisms." *J Physiol* **540**: 261-269.
- Durand S., Fromy B., Humeau A., Sigauco-Roussel D., Saumet J. L. and Abraham P. (2002c). "Break excitation alone does not explain the delay and amplitude of anodal current-induced vasodilatation in human skin." *J Physiol* **542**: 549-557.
- Durand S., Fromy B., Koitka A., Tartas M., Saumet J. L. and Abraham P. (2002d). "Oral single high-dose aspirin results in a long-lived inhibition of anodal current-induced vasodilatation." *Br J Pharmacol* **137**: 384-390.
- Durand S., Fromy B., Tartas M., Jardel A., Saumet J. L. and Abraham P. (2003). "Prolonged aspirin inhibition of anodal vasodilation is not due to the trafficking delay of neural mediators." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**: R155-161.
- Dusch M., Schley M., Obreja O., Forsch E., Schmelz M. and Rukwied R. (2009). "Comparison of electrically induced flare response patterns in human and pig skin." *Inflamm Res* **58**: 639-648.
- Dusch M., Schley M., Rukwied R. and Schmelz M. (2007). "Rapid flare development evoked by current frequency-dependent stimulation analyzed by full-field laser perfusion imaging." *Neuroreport* **18**: 1101-1105.
- Emonds-Alt X., Doutremepuich J. D., Heulme M., Neliat G., Santucci V., Steinberg R., Vilain P., Bichon D., Ducoux J. P., Proietto V. and et al. (1993). "In vitro and in vivo

- biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist." *Eur J Pharmacol* **250**: 403-413.
- Escott K. J. and Brain S. D. (1993). "Effect of a calcitonin gene-related peptide antagonist (CGRP8-37) on skin vasodilatation and oedema induced by stimulation of the rat saphenous nerve." *Br J Pharmacol* **110**: 772-776.
- Faisy C., Planquette B., Naline E., Risse P. A., Frossard N., Fagon J. Y., Advenier C. and Devillier P. (2007). "Acid-induced modulation of airway basal tone and contractility: role of acid-sensing ion channels (ASICs) and TRPV1 receptor." *Life Sci* **81**: 1094-1102.
- Ferrell W. R., Ramsay J. E., Brooks N., Lockhart J. C., Dickson S., McNeece G. M., Greer I. A. and Sattar N. (2002). "Elimination of electrically induced iontophoretic artefacts: implications for non-invasive assessment of peripheral microvascular function." *J Vasc Res* **39**: 447-455.
- Fischer M. J., Reeh P. W. and Sauer S. K. (2003). "Proton-induced calcitonin gene-related peptide release from rat sciatic nerve axons, in vitro, involving TRPV1." *Eur J Neurosci* **18**: 803-810.
- Fizanne L., Fromy B., Preckel M. P., Sigaudou-Roussel D. and Saumet J. L. (2003). "Effect of isoflurane on skin-pressure-induced vasodilation." *J Vasc Res* **40**: 416-422.
- Fizanne L., Sigaudou-Roussel D., Saumet J. L. and Fromy B. (2004). "Evidence for the involvement of VPAC1 and VPAC2 receptors in pressure-induced vasodilatation in rodents." *J Physiol* **554**: 519-528.
- Franco-Cereceda A., Kallner G. and Lundberg J. M. (1993). "Capsazepine-sensitive release of calcitonin gene-related peptide from C-fibre afferents in the guinea-pig heart by low pH and lactic acid." *Eur J Pharmacol* **238**: 311-316.
- Franco-Cereceda A., Kallner G. and Lundberg J. M. (1994). "Cyclo-oxygenase products released by low pH have capsaicin-like actions on sensory nerves in the isolated guinea pig heart." *Cardiovasc Res* **28**: 365-369.
- Franco-Cereceda A. and Lundberg J. M. (1992). "Capsazepine inhibits low pH- and lactic acid-evoked release of calcitonin gene-related peptide from sensory nerves in guinea-pig heart." *Eur J Pharmacol* **221**: 183-184.
- Fromy B., Abraham P. and Saumet J. L. (1998). "Non-nociceptive capsaicin-sensitive nerve terminal stimulation allows for an original vasodilatory reflex in the human skin." *Brain Res* **811**: 166-168.
- Fromy B., Merzeau S., Abraham P. and Saumet J. L. (2000). "Mechanisms of the cutaneous vasodilator response to local external pressure application in rats: involvement of CGRP, neurokinins, prostaglandins and NO." *Br J Pharmacol* **131**: 1161-1171.
- Fromy B., Sigaudou-Roussel D., Baron C., Roquelaure Y., Leftheriotis G. and Saumet J. L. (2007). "Neuroendocrine pathway involvement in the loss of the cutaneous pressure-induced vasodilatation during acute pain in rats." *J Physiol* **579**: 247-254.
- Fromy B., Sigaudou-Roussel D., Gaubert-Dahan M. L., Rousseau P., Abraham P., Benzoni D., Berrut G. and Saumet J. L. (2010). "Aging-associated sensory neuropathy alters pressure-induced vasodilation in humans." *J Invest Dermatol* **130**: 849-855.
- Fromy B., Sigaudou-Roussel D. and Saumet J. L. (2008). "Cutaneous neurovascular interaction involved in tactile sensation." *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **6**: 337-342.
- Fukushima K., Aoi Y., Kato S. and Takeuchi K. (2006). "Gastro-protective action of lafutidine mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons without interaction with TRPV1 and involvement of endogenous prostaglandins." *World J Gastroenterol* **12**: 3031-3037.

- Funakoshi K., Nakano M., Atobe Y., Goris R. C., Kadota T. and Yazama F. (2006). "Differential development of TRPV1-expressing sensory nerves in peripheral organs." *Cell Tissue Res* **323**: 27-41.
- Furutani K., Ikoma M., Ishii H., Baba H. and Kohno T. "Bupivacaine inhibits glutamatergic transmission in spinal dorsal horn neurons." *Anesthesiology* **112**: 138-143.
- Gallicchio M., Rosa A. C., Benetti E., Collino M., Dianzani C. and Fantozzi R. (2006). "Substance P-induced cyclooxygenase-2 expression in human umbilical vein endothelial cells." *Br J Pharmacol* **147**: 681-689.
- Gamse R., Molnar A. and Lembeck F. (1979). "Substance P release from spinal cord slices by capsaicin." *Life Sci* **25**: 629-636.
- Gamse R. and Saria A. (1985). "Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide." *Eur J Pharmacol* **114**: 61-66.
- Garnett W. R. (2001). "Clinical implications of drug interactions with coxibs." *Pharmacotherapy* **21**: 1223-1232.
- Garry A., Fromy B., Blondeau N., Henrion D., Brau F., Gounon P., Guy N., Heurteaux C., Lazdunski M. and Saumet J. L. (2007). "Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link." *EMBO Rep* **8**: 354-359.
- Garry A., Sigaudou-Roussel D., Merzeau S., Dumont O., Saumet J. L. and Fromy B. (2005). "Cellular mechanisms underlying cutaneous pressure-induced vasodilation: in vivo involvement of potassium channels." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H174-180.
- Gaubert M. L., Sigaudou-Roussel D., Tartas M., Berrut G., Saumet J. L. and Fromy B. (2007). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice." *J Physiol* **585**: 617-626.
- Gault W. R. and Gatens P. F., Jr. (1976). "Use of low intensity direct current in management of ischemic skin ulcers." *Phys Ther* **56**: 265-269.
- Gibbins I. L., Furness J. B., Costa M., MacIntyre I., Hillyard C. J. and Girgis S. (1985). "Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs." *Neurosci Lett* **57**: 125-130.
- Gohin S., Sigaudou-Roussel D., Conjard-Duplany A., Dubourg L., Saumet J. L. and Fromy B. (2011). "What can current stimulation tell us about the vascular function of endogenous prostacyclin in healthy rat skin in vivo?" *J Invest Dermatol* **131**: 237-244.
- Grossmann M., Jamieson M. J., Kellogg D. L., Jr., Kosiba W. A., Pergola P. E., Crandall C. G. and Shepherd A. M. (1995). "The effect of iontophoresis on the cutaneous vasculature: evidence for current-induced hyperemia." *Microvasc Res* **50**: 444-452.
- Guirimand F. and Le Bars D. (1996). "[Physiology of nociception]." *Ann Fr Anesth Reanim* **15**: 1048-1079.
- Guo A., Vulchanova L., Wang J., Li X. and Elde R. (1999). "Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites." *Eur J Neurosci* **11**: 946-958.
- Habler H. J., Timmermann L., Stegmann J. U. and Janig W. (1999). "Involvement of neurokinins in antidromic vasodilatation in hairy and hairless skin of the rat hindlimb." *Neuroscience* **89**: 1259-1268.
- Hachem J. P., Behne M., Aronchik I., Demerjian M., Feingold K. R., Elias P. M. and Mauro T. M. (2005). "Extracellular pH Controls NHE1 expression in epidermis and keratinocytes: implications for barrier repair." *J Invest Dermatol* **125**: 790-797.
- Hagner S., Haberberger R. V., Overkamp D., Hoffmann R., Voigt K. H. and McGregor G. P. (2002). "Expression and distribution of calcitonin receptor-like receptor in human hairy skin." *Peptides* **23**: 109-116.

- Hamdy O., Abou-Elenin K., LoGerfo F. W., Horton E. S. and Veves A. (2001). "Contribution of nerve-axon reflex-related vasodilation to the total skin vasodilation in diabetic patients with and without neuropathy." *Diabetes Care* **24**: 344-349.
- Han J. S., Adwanikar H., Li Z., Ji G. and Neugebauer V. (2010). "Facilitation of synaptic transmission and pain responses by CGRP in the amygdala of normal rats." *Mol Pain* **6**: 10.
- Harada N., Okajima K., Uchiba M. and Katsuragi T. (2003). "Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**: G1214-1224.
- Harrington L. S., Carrier M. J., Gallagher N., Gilroy D., Garland C. J. and Mitchell J. A. (2007). "Elucidation of the temporal relationship between endothelial-derived NO and EDHF in mesenteric vessels." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H1682-1688.
- Hayes S. G., Kindig A. E. and Kaufman M. P. (2007). "Blockade of acid sensing ion channels attenuates the exercise pressor reflex in cats." *J Physiol* **581**: 1271-1282.
- Hingtgen C. M. and Vasko M. R. (1994). "Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons." *Brain Res* **655**: 51-60.
- Hingtgen C. M., Waite K. J. and Vasko M. R. (1995). "Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade." *J Neurosci* **15**: 5411-5419.
- Hirota K., Browne T., Appadu B. L. and Lambert D. G. (1997). "Do local anaesthetics interact with dihydropyridine binding sites on neuronal L-type Ca²⁺ channels?" *Br J Anaesth* **78**: 185-188.
- Holzer P. (1991). "Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons." *Pharmacol Rev* **43**: 143-201.
- Holzer P. (2009). "Acid-sensitive ion channels and receptors." *Handb Exp Pharmacol* **194**: 283-332.
- Horvath G., Kekesi G., Nagy E. and Benedek G. (2008). "The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level." *Pain* **134**: 277-284.
- Huang S. M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T. J., Krey J. F., Chu C. J., Miller J. D., Davies S. N., Geppetti P., Walker J. M. and Di Marzo V. (2002). "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8400-8405.
- Hughes S. R. and Brain S. D. (1991). "A calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist (CGRP8-37) inhibits microvascular responses induced by CGRP and capsaicin in skin." *Br J Pharmacol* **104**: 738-742.
- Hwang S. W., Cho H., Kwak J., Lee S. Y., Kang C. J., Jung J., Cho S., Min K. H., Suh Y. G., Kim D. and Oh U. (2000). "Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6155-6160.
- Inoue K., Koizumi S., Fuziwara S., Denda S., Inoue K. and Denda M. (2002). "Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 124-129.
- Jaffe E. A. and Weksler B. B. (1979). "Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin." *J Clin Invest* **63**: 532-535.
- Jiang N., Rau K. K., Johnson R. D. and Cooper B. Y. (2006). "Proton sensitivity Ca²⁺ permeability and molecular basis of acid-sensing ion channels expressed in glabrous and hairy skin afferents." *J Neurophysiol* **95**: 2466-2478.

- Johns R. A., Tichotsky A., Muro M., Spaeth J. P., Le Cras T. D. and Rengasamy A. (1995). "Halothane and isoflurane inhibit endothelium-derived relaxing factor-dependent cyclic guanosine monophosphate accumulation in endothelial cell-vascular smooth muscle co-cultures independent of an effect on guanylyl cyclase activation." *Anesthesiology* **83**: 823-834.
- Jones N. G., Slater R., Cadiou H., McNaughton P. and McMahon S. B. (2004). "Acid-induced pain and its modulation in humans." *J Neurosci* **24**: 10974-10979.
- Kallner G. and Franco-Cereceda A. (1998). "Ion channels involved in the release of calcitonin gene-related peptide by low pH, prostacyclin and capsaicin in the isolated guinea-pig heart." *Eur J Pharmacol* **352**: 223-228.
- Kampfer H., Brautigam L., Geisslinger G., Pfeilschifter J. and Frank S. (2003). "Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair." *J Invest Dermatol* **120**: 880-890.
- Kanai Y., Hara T. and Imai A. (2006). "Participation of the spinal TRPV1 receptors in formalin-evoked pain transduction: a study using a selective TRPV1 antagonist, iodoresiniferatoxin." *J Pharm Pharmacol* **58**: 489-493.
- Kanai Y., Tateyama S., Nakamura T., Kasaba T. and Takasaki M. (1999). "Effects of levobupivacaine, bupivacaine, and ropivacaine on tail-flick response and motor function in rats following epidural or intrathecal administration." *Reg Anesth Pain Med* **24**: 444-452.
- Kangrga I. and Randic M. (1990). "Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice." *J Neurosci* **10**: 2026-2038.
- Karai L. J., Russell J. T., Iadarola M. J. and Olah Z. (2004). "Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons." *J Biol Chem* **279**: 16377-16387.
- Kato K., Yang H. and Tache Y. (1996). "Role of prostaglandins and calcitonin gene-related peptide in central vagal cholinergic-dependent protection against gastric injury in urethane-anesthetized rats." *Digestion* **57**: 322-327.
- Kauppila T., Kontinen V. K., Wei H., Jyvasjarvi E. and Pertovaara A. (2002). "Cutaneous vascular responses evoked by noxious stimulation in rats with the spinal nerve ligation-induced model of neuropathy." *Brain Res Bull* **58**: 21-26.
- Kellenberger S. and Schild L. (2002). "Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure." *Physiol Rev* **82**: 735-767.
- Kellogg D. L., Jr., Liu Y., Kosiba I. F. and O'Donnell D. (1999). "Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans." *J Appl Physiol* **86**: 1185-1190.
- Kellogg D. L., Jr., Zhao J. L., Coey U. and Green J. V. (2005). "Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin." *J Appl Physiol* **98**: 629-632.
- Khalil Z. and Merhi M. (2000). "Effects of aging on neurogenic vasodilator responses evoked by transcutaneous electrical nerve stimulation: relevance to wound healing." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**: B257-263.
- Kilo S., Harding-Rose C., Hargreaves K. M. and Flores C. M. (1997). "Peripheral CGRP release as a marker for neurogenic inflammation: a model system for the study of neuropeptide secretion in rat paw skin." *Pain* **73**: 201-207.
- Komai H. and McDowell T. S. (2005). "Differential effects of bupivacaine and tetracaine on capsaicin-induced currents in dorsal root ganglion neurons." *Neurosci Lett* **380**: 21-25.

- Kong L. L. and Yu L. C. (2006). "Involvement of mu- and delta-opioid receptors in the antinociceptive effects induced by AMPA receptor antagonist in the spinal cord of rats." *Neurosci Lett* **402**: 180-183.
- Kress M., Guthmann C., Averbeck B. and Reeh P. W. (1999). "Calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro." *Neuroscience* **89**: 303-310.
- Kuesgen B., Frankel H. L. and Anand P. (2002). "Decreased cutaneous sensory axon-reflex vasodilatation below the lesion in patients with complete spinal cord injury." *Somatosens Mot Res* **19**: 149-152.
- Kwak J. Y., Jung J. Y., Hwang S. W., Lee W. T. and Oh U. (1998). "A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance." *Neuroscience* **86**: 619-626.
- Le Bars D. (2002). "The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones." *Brain Res Brain Res Rev* **40**: 29-44.
- Le Bars D. and Adam F. (2002). "Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aiguë inflammatoire." *Ann Fr Anesth Réani* **21**: 315-335.
- Le Bars D., Gozariu M. and Cadden S. W. (2001). "Animal models of nociception." *Pharmacol Rev* **53**: 597-652.
- Leffler A., Monter B. and Koltzenburg M. (2006). "The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice." *Neuroscience* **139**: 699-709.
- Leong J., Hughes-Fulford M., Rakhlin N., Habib A., Maclouf J. and Goldyne M. E. (1996). "Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation." *Exp Cell Res* **224**: 79-87.
- Li Z., Tam E. W., Lau R. Y., So K. F., Wu W. and Mak A. F. (2009). "Post pressure response of skin blood flow motions in anesthetized rats with spinal cord injury." *Microvasc Res* **78**: 20-24.
- Lin Q., Li D., Xu X., Zou X. and Fang L. (2007). "Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin." *Mol Pain* **3**: 30.
- Lindgren M., Unosson M., Krantz A. M. and Ek A. C. (2005). "Pressure ulcer risk factors in patients undergoing surgery." *J Adv Nurs* **50**: 605-612.
- Lingueglia E. (2007). "Acid-sensing ion channels in sensory perception." *J Biol Chem* **282**: 17325-17329.
- Lingueglia E., de Weille J. R., Bassilana F., Heurteaux C., Sakai H., Waldmann R. and Lazdunski M. (1997). "A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells." *J Biol Chem* **272**: 29778-29783.
- Liou J. Y., Shyue S. K., Tsai M. J., Chung C. L., Chu K. Y. and Wu K. K. (2000). "Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells." *J Biol Chem* **275**: 15314-15320.
- Liu B. G., Zhuang X. L., Li S. T. and Xu G. H. (2000). "The effects of ropivacaine on sodium currents in dorsal horn neurons of neonatal rats." *Anesth Analg* **90**: 1034-1038.
- Lloyd D. P. (1962). "The classification of galvanic skin reflex afferent fibers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 814-817.
- Luckhoff A., Pohl U., Mulsch A. and Busse R. (1988). "Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells." *Br J Pharmacol* **95**: 189-196.

- Luo H., Cheng J., Han J. S. and Wan Y. (2004). "Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats." *Neuroreport* **15**: 655-658.
- Lutfy K., Cai S. X., Woodward R. M. and Weber E. (1997). "Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice." *Pain* **70**: 31-40.
- Lynn B. (1992). "Capsaicin: actions on C fibre afferents that may be involved in itch." *Skin Pharmacol* **5**: 9-13.
- Maingret F. and Delmas P. (2008). "The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain." *DOULEUR ET ANALGÉSIE* **21**: 194-202.
- Malki S., Declosmenil F., Farhat A., Moniot B., Poulat F. and Boizet-Bonhoure B. (2008). "[Prostaglandin D2: new roles in the embryonic and pathological gonad]." *Med Sci (Paris)* **24**: 177-183.
- Mantyh P. W., Clohisy D. R., Koltzenburg M. and Hunt S. P. (2002). "Molecular mechanisms of cancer pain." *Nat Rev Cancer* **2**: 201-209.
- Masereel B., Pochet L. and Laeckmann D. (2003). "An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger." *Eur J Med Chem* **38**: 547-554.
- Matta J. A., Miyares R. L. and Ahern G. P. (2007). "TRPV1 is a novel target for omega-3 polyunsaturated fatty acids." *J Physiol* **578**: 397-411.
- Meade E. A., Smith W. L. and DeWitt D. L. (1993). "Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs." *J Biol Chem* **268**: 6610-6614.
- Mehmandoust F. G., Torkaman G., Firoozabadi M. and Talebi G. (2007). "Anodal and cathodal pulsed electrical stimulation on skin wound healing in guinea pigs." *J Rehabil Res Dev* **44**: 611-618.
- Mestre C., Pelissier T., Fialip J., Wilcox G. and Eschalier A. (1994). "A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats." *J Pharmacol Toxicol Methods* **32**: 197-200.
- Minson C. T., Berry L. T. and Joyner M. J. (2001). "Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating." *J Appl Physiol* **91**: 1619-1626.
- Mitchell J. A., Ali F., Bailey L., Moreno L. and Harrington L. S. (2008). "Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium." *Exp Physiol* **93**: 141-147.
- Mitchell J. A., Lucas R., Vojnovic I., Hasan K., Pepper J. R. and Warner T. D. (2006). "Stronger inhibition by nonsteroid anti-inflammatory drugs of cyclooxygenase-1 in endothelial cells than platelets offers an explanation for increased risk of thrombotic events." *FASEB J* **20**: 2468-2475.
- Mitchell J. A. and Warner T. D. (1999). "Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy." *Br J Pharmacol* **128**: 1121-1132.
- Mizutani A., Okajima K., Murakami K., Mizutani S., Kudo K., Uchino T., Kadoi Y. and Noguchi T. (2009). "Activation of sensory neurons reduces ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats." *Anesthesiology* **110**: 361-369.
- Morris S. J. and Shore A. C. (1996). "Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms." *J Physiol* **496**: 531-542.
- Mustard J. F., Kinlough-Rathbone R. L. and Packham M. A. (1980). "Prostaglandins and platelets." *Annu Rev Med* **31**: 89-96.
- Nakanishi M., Hata K., Nagayama T., Sakurai T., Nishisho T., Wakabayashi H., Hiraga T., Ebisu S. and Yoneda T. "Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the

- CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain." *Mol Biol Cell* **21**: 2568-2577.
- Needleman P., Moncada S., Bunting S., Vane J. R., Hamberg M. and Samuelsson B. (1976). "Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides." *Nature* **261**: 558-560.
- Ojingwa J. C. and Isseroff R. R. (2003). "Electrical stimulation of wound healing." *J Invest Dermatol* **121**: 1-12.
- Olausson H., Lamarre Y., Backlund H., Morin C., Wallin B. G., Starck G., Ekholm S., Strigo I., Worsley K., Vallbo A. B. and Bushnell M. C. (2002). "Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex." *Nat Neurosci* **5**: 900-904.
- Peirce S. M., Skalak T. C. and Rodeheaver G. T. (2000). "Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat." *Wound Repair Regen* **8**: 68-76.
- Perkins M. N. and Campbell E. A. (1992). "Capsazepine reversal of the antinociceptive action of capsaicin in vivo." *Br J Pharmacol* **107**: 329-333.
- Perl E. R. (2007). "Ideas about pain, a historical view." *Nat Rev Neurosci* **8**: 71-80.
- Petersen L. J., Church M. K. and Skov P. S. (1997a). "Histamine is released in the wheal but not the flare following challenge of human skin in vivo: a microdialysis study." *Clin Exp Allergy* **27**: 284-295.
- Petersen L. J., Winge K., Brodin E. and Skov P. S. (1997b). "No release of histamine and substance P in capsaicin-induced neurogenic inflammation in intact human skin in vivo: a microdialysis study." *Clin Exp Allergy* **27**: 957-965.
- Petho G., Izydorczyk I. and Reeh P. W. (2004). "Effects of TRPV1 receptor antagonists on stimulated iCGRP release from isolated skin of rats and TRPV1 mutant mice." *Pain* **109**: 284-290.
- Puigdellivol-Sanchez A., Forcada-Calvet P., Prats-Galino A. and Molander C. (2000). "Contribution of femoral and proximal sciatic nerve branches to the sensory innervation of hindlimb digits in the rat." *Anat Rec* **260**: 180-188.
- Quartara L. and Maggi C. A. (1997). "The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation." *Neuropeptides* **31**: 537-563.
- Ramadan A., Elsaidy M. and Zyada R. (2008). "Effect of low-intensity direct current on the healing of chronic wounds: a literature review." *J Wound Care* **17**: 292-296.
- Rinder J. and Lundberg J. M. (1996). "Effects of hCGRP 8-37 and the NK1-receptor antagonist SR 140.333 on capsaicin-evoked vasodilation in the pig nasal mucosa in vivo." *Acta Physiol Scand* **156**: 115-122.
- Roosterman D., Goerge T., Schneider S. W., Bunnett N. W. and Steinhoff M. (2006). "Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ." *Physiol Rev* **86**: 1309-1379.
- Rousseau P., Mahe G., Fromy B., Ducluzeau P. H., Saumet J. L. and Abraham P. (2009). "Axon-reflex cutaneous vasodilatation is impaired in type 2 diabetic patients receiving chronic low-dose aspirin." *Microvasc Res* **78**: 218-223.
- Rousseau P., Tartas M., Fromy B., Godon A., Custaud M. A., Saumet J. L. and Abraham P. (2008). "Platelet inhibition by low-dose aspirin but not by clopidogrel reduces the axon-reflex current-induced vasodilation in humans." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**: R1420-1426.
- Rowley B. A. (1972). "Electrical current effects on E. coli growth rates." *Proc Soc Exp Biol Med* **139**: 929-934.
- Rukwied R., Chizh B. A., Lorenz U., Obreja O., Margarit S., Schley M. and Schmelz M. (2007). "Potentiation of nociceptive responses to low pH injections in humans by prostaglandin E₂." *J Pain* **8**: 443-451.

- Safar M. E. and Lacolley P. (2007). "Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H1-7.
- Sakura S., Kirihara Y., Mugeruma T., Kishimoto T. and Saito Y. (2005). "The comparative neurotoxicity of intrathecal lidocaine and bupivacaine in rats." *Anesth Analg* **101**: 541-547, table of contents.
- Santicioli P., Del Bianco E., Figini M., Bevan S. and Maggi C. A. (1993). "Effect of capsazepine on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity (CGRP-LI) induced by low pH, capsaicin and potassium in rat soleus muscle." *Br J Pharmacol* **110**: 609-612.
- Saria A., Gamse R., Petermann J., Fischer J. A., Theodorsson-Norheim E. and Lundberg J. M. (1986). "Simultaneous release of several tachykinins and calcitonin gene-related peptide from rat spinal cord slices." *Neurosci Lett* **63**: 310-314.
- Saria A. and Lundberg J. M. (1983). "Capsaicin pretreatment inhibits heat-induced oedema in the rat skin." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **323**: 341-342.
- Sato K., Timm D. E., Sato F., Templeton E. A., Meletiou D. S., Toyomoto T., Soos G. and Sato S. K. (1993). "Generation and transit pathway of H⁺ is critical for inhibition of palmar sweating by iontophoresis in water." *J Appl Physiol* **75**: 2258-2264.
- Sauerstein K., Klede M., Hilliges M. and Schmelz M. (2000a). "Electrically evoked neuropeptide release and neurogenic inflammation differ between rat and human skin." *J Physiol* **529 Pt 3**: 803-810.
- Sauerstein K., Klede M., Hilliges M. and Schmelz M. (2000b). "Electrically evoked neuropeptide release and neurogenic inflammation differ between rat and human skin." *J Physiol* **529**: 803-810.
- Schmelz M., Luz O., Averbek B. and Bickel A. (1997). "Plasma extravasation and neuropeptide release in human skin as measured by intradermal microdialysis." *Neurosci Lett* **230**: 117-120.
- Schmelz M., Michael K., Weidner C., Schmidt R., Torebjork H. E. and Handwerker H. O. (2000). "Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin?" *Neuroreport* **11**: 645-648.
- Schmelz M. and Petersen L. J. (2001). "Neurogenic inflammation in human and rodent skin." *News Physiol Sci* **16**: 33-37.
- Scholz J. and Woolf C. J. (2002). "Can we conquer pain?" *Nat Neurosci* **5 Suppl**: 1062-1067.
- Scholzen T., Armstrong C. A., Bunnnett N. W., Luger T. A., Olerud J. E. and Ansel J. C. (1998). "Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems." *Exp Dermatol* **7**: 81-96.
- Schwarz U. R., Walter U. and Eigenthaler M. (2001). "Taming platelets with cyclic nucleotides." *Biochem Pharmacol* **62**: 1153-1161.
- Severens J. L., Habraken J. M., Duivenvoorden S. and Frederiks C. M. (2002). "The cost of illness of pressure ulcers in The Netherlands." *Adv Skin Wound Care* **15**: 72-77.
- Shehab S. A., Spike R. C. and Todd A. J. (2004). "Do central terminals of intact myelinated primary afferents sprout into the superficial dorsal horn of rat spinal cord after injury to a neighboring peripheral nerve?" *J Comp Neurol* **474**: 427-437.
- Sigaudo-Roussel D., Demiot C., Fromy B., Koitka A., Leftheriotis G., Abraham P. and Saumet J. L. (2004). "Early endothelial dysfunction severely impairs skin blood flow response to local pressure application in streptozotocin-induced diabetic mice." *Diabetes* **53**: 1564-1569.
- Southall M. D., Li T., Gharibova L. S., Pei Y., Nicol G. D. and Travers J. B. (2003). "Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes." *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 217-222.

- Spicarova D. and Palecek J. (2008). "The role of spinal cord vanilloid (TRPV1) receptors in pain modulation." *Physiol Res* **57 Suppl 3**: S69-77.
- Stander S., Moormann C., Schumacher M., Buddenkotte J., Artuc M., Shpacovitch V., Brzoska T., Lippert U., Henz B. M., Luger T. A., Metze D. and Steinhoff M. (2004). "Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures." *Exp Dermatol* **13**: 129-139.
- Starowicz K., Nigam S. and Di Marzo V. (2007). "Biochemistry and pharmacology of endovanilloids." *Pharmacol Ther* **114**: 13-33.
- Steen K. H. and Reeh P. W. (1993). "Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin." *Neurosci Lett* **154**: 113-116.
- Steen K. H., Reeh P. W., Anton F. and Handwerker H. O. (1992). "Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro." *J Neurosci* **12**: 86-95.
- Steinhoff M., Stander S., Seeliger S., Ansel J. C., Schmelz M. and Luger T. (2003). "Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation." *Arch Dermatol* **139**: 1479-1488.
- Stitham J., Arehart E. J., Gleim S. R., Douville K. L. and Hwa J. (2007). "Human prostacyclin receptor structure and function from naturally-occurring and synthetic mutations." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **82**: 95-108.
- Strecker T., Messlinger K., Weyand M. and Reeh P. W. (2005). "Role of different proton-sensitive channels in releasing calcitonin gene-related peptide from isolated hearts of mutant mice." *Cardiovasc Res* **65**: 405-410.
- Stucker M., Struk A., Altmeyer P., Herde M., Baumgartl H. and Lubbers D. W. (2002). "The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis." *J Physiol* **538**: 985-994.
- Sugimoto M., Arai I., Futaki N., Hashimoto Y., Honma Y. and Nakaike S. (2006). "Role of COX-1 and COX-2 on skin PGs biosynthesis by mechanical scratching in mice." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**: 1-8.
- Sun R. Q., Lawand N. B., Lin Q. and Willis W. D. (2004a). "Role of calcitonin gene-related peptide in the sensitization of dorsal horn neurons to mechanical stimulation after intradermal injection of capsaicin." *J Neurophysiol* **92**: 320-326.
- Sun R. Q., Tu Y. J., Lawand N. B., Yan J. Y., Lin Q. and Willis W. D. (2004b). "Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization." *J Neurophysiol* **92**: 2859-2866.
- Szallasi A. and Blumberg P. M. (1999). "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms." *Pharmacol Rev* **51**: 159-212.
- Szallasi A., Goso C., Blumberg P. M. and Manzini S. (1993). "Competitive inhibition by capsazepine of [³H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 728-733.
- Szolcsanyi J. (2004). "Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology." *Neuropeptides* **38**: 377-384.
- Taguchi T., Kawasaki H., Imamura T. and Takasaki K. (1992). "Endogenous calcitonin gene-related peptide mediates nonadrenergic noncholinergic depressor response to spinal cord stimulation in the pithed rat." *Circ Res* **71**: 357-364.
- Tartas M., Bouye P., Koitka A., Durand S., Gallois Y., Saumet J. L. and Abraham P. (2005a). "Early vasodilator response to anodal current application in human is not impaired by cyclooxygenase-2 blockade." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H1668-1673.
- Tartas M., Bouye P., Koitka A., Jaquinandi V., Tan L., Saumet J. L. and Abraham P. (2005b). "Cathodal current-induced vasodilation to single application and the amplified

- response to repeated application in humans rely on aspirin-sensitive mechanisms." *J Appl Physiol* **99**: 1538-1544.
- Tartas M., Durand S., Koitka A., Bouye P., Saumet J. L. and Abraham P. (2004). "Anodal current intensities above 40 microA interfere with current-induced axon-reflex vasodilatation in human skin." *J Vasc Res* **41**: 261-267.
- Tohda C. and Kuraishi Y. (1996). "Visualization of glutamate release from rat spinal cord with a confocal laser scanning microscope." *Neurosci Res* **24**: 183-187.
- Tominaga M., Caterina M. J., Malmberg A. B., Rosen T. A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B. E., Basbaum A. I. and Julius D. (1998). "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli." *Neuron* **21**: 531-543.
- Tortora and Grabowski (2000). Principes d'anatomie et de physiologie.
- Ugawa S., Ueda T., Ishida Y., Nishigaki M., Shibata Y. and Shimada S. (2002). "Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors." *J Clin Invest* **110**: 1185-1190.
- Valtschanoff J. G., Rustioni A., Guo A. and Hwang S. J. (2001). "Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn." *J Comp Neurol* **436**: 225-235.
- Vanhoutte (2001). "Endothelium-derived free radicals: for worse and for better." *The journal of Clinical Investigation* **107**: 1521-1530.
- Vivancos G. G., Verri W. A., Jr., Cunha T. M., Schivo I. R., Parada C. A., Cunha F. Q. and Ferreira S. H. (2004). "An electronic pressure-meter nociception paw test for rats." *Braz J Med Biol Res* **37**: 391-399.
- Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flockerzi V. and Nilius B. (2004). "The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels." *Nature* **430**: 748-754.
- Voilley N., de Weille J., Mamet J. and Lazdunski M. (2001). "Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors." *J Neurosci* **21**: 8026-8033.
- Waldmann R., Bassilana F., de Weille J., Champigny G., Heurteaux C. and Lazdunski M. (1997a). "Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons." *J Biol Chem* **272**: 20975-20978.
- Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C. and Lazdunski M. (1997b). "A proton-gated cation channel involved in acid-sensing." *Nature* **386**: 173-177.
- Wallengren J. and Hakanson R. (1987). "Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses." *Eur J Pharmacol* **143**: 267-273.
- Walpole C. S., Bevan S., Bovermann G., Boelsterli J. J., Breckenridge R., Davies J. W., Hughes G. A., James I., Oberer L., Winter J. and et al. (1994). "The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin." *J Med Chem* **37**: 1942-1954.
- Wang Y., Novotny M., Quaiserova-Mocko V., Swain G. M. and Wang D. H. (2008). "TRPV1-mediated protection against endotoxin-induced hypotension and mortality in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**: R1517-1523.
- Warren J. B. (1994). "Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light." *FASEB J* **8**: 247-251.
- Weidner C., Klede M., Rukwied R., Lischetzki G., Neisius U., Skov P. S., Petersen L. J. and Schmelz M. (2000). "Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin--a microdialysis study." *J Invest Dermatol* **115**: 1015-1020.
- Wemmie J. A., Price M. P. and Welsh M. J. (2006). "Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities." *Trends Neurosci* **29**: 578-586.

- Westerman R. A., Widdop R. E., Hogan C. and Zimmet P. (1987). "Non-invasive tests of neurovascular function: reduced responses in diabetes mellitus." *Neurosci Lett* **81**: 177-182.
- White D. J., Maass D. L., Sanders B. and Horton J. W. (2002). "Cardiomyocyte intracellular calcium and cardiac dysfunction after burn trauma." *Crit Care Med* **30**: 14-22.
- White D. M. (1996). "Mechanism of prostaglandin E₂-induced substance P release from cultured sensory neurons." *Neuroscience* **70**: 561-565.
- White D. M. and Helme R. D. (1985). "Release of substance P from peripheral nerve terminals following electrical stimulation of the sciatic nerve." *Brain Res* **336**: 27-31.
- Yamamura H., Ugawa S., Ueda T., Nagao M. and Shimada S. (2008). "Epithelial Na⁺ channel delta subunit mediates acid-induced ATP release in the human skin." *Biochem Biophys Res Commun* **373**: 155-158.
- Yanagitate F. and Strichartz G. R. (2006). "Bupivacaine inhibits activation of neuronal spinal extracellular receptor-activated kinase through selective effects on ionotropic receptors." *Anesthesiology* **104**: 805-814.
- Yang K., Kumamoto E., Furue H. and Yoshimura M. (1998a). "Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord." *Neurosci Lett* **255**: 135-138.
- Yang S. N., Wu J. N., Liu D. and Tung C. S. (1998b). "Metabotropic glutamate receptors are involved in calcium-induced LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated responses in the rat hippocampus." *Brain Res Bull* **46**: 505-512.
- Yoshimura M. and Jessell T. (1990). "Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord." *J Physiol* **430**: 315-335.
- You H. J. and Arendt-Nielsen L. (2005). "Unilateral subcutaneous bee venom but not formalin injection causes contralateral hypersensitized wind-up and after-discharge of the spinal withdrawal reflex in anesthetized spinal rats." *Exp Neurol* **195**: 148-160.
- Yu L., Yang F., Luo H., Liu F. Y., Han J. S., Xing G. G. and Wan Y. (2008). "The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant." *Mol Pain* **4**: 61.
- Yu L. C., Hansson P. and Lundberg T. (1996). "The calcitonin gene-related peptide antagonist CGRP8-37 increases the latency to withdrawal responses bilaterally in rats with unilateral experimental mononeuropathy, an effect reversed by naloxone." *Neuroscience* **71**: 523-531.
- Zhong B. and Wang D. H. (2007a). "TRPV1 gene knockout impairs preconditioning protection against myocardial injury in isolated perfused hearts in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H1791-1798.
- Zhong G., Masino M. A. and Harris-Warrick R. M. (2007b). "Persistent sodium currents participate in fictive locomotion generation in neonatal mouse spinal cord." *J Neurosci* **27**: 4507-4518.
- Zhou H. Y., Chen S. R., Chen H. and Pan H. L. (2009). "The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn." *J Neurochem* **108**: 305-318.
- Zygmunt P. M., Petersson J., Andersson D. A., Chuang H., Sorgard M., Di Marzo V., Julius D. and Hogestatt E. D. (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." *Nature* **400**: 452-457.